

Titre: Simulation numérique de l'opération de pièges microfluidiques à échantillons
Title:

Auteur: Nassim Rousset
Author:

Date: 2016

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Rousset, N. (2016). Simulation numérique de l'opération de pièges microfluidiques à échantillons [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/2376/>
Citation:

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/2376/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: Thomas Gervais
Advisors:

Programme: Génie physique
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

SIMULATION NUMÉRIQUE DE L'OPÉRATION DE PIÈGES MICROFLUIDIQUES À
ÉCHANTILLONS

NASSIM ROUSSET

DÉPARTEMENT DE GÉNIE PHYSIQUE
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE PHYSIQUE)

OCTOBRE 2016

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

SIMULATION NUMÉRIQUE DE L'OPÉRATION DE PIÈGES MICROFLUIDIQUES À
ÉCHANTILLONS

présenté par : ROUSSET Nassim

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. PETER Yves-Alain, D. Sc., président

M. GERVAIS Thomas, Ph. D., membre et directeur de recherche

M. PERRIER Michel, Ph. D., membre

DÉDICACE

*À ma mère,
Qui m'a créé, éduqué, poussé, encouragé.*

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, Thomas Gervais, pour ses conseils, son support, ses idées et son accueil dans son groupe de recherche. Son expertise en modélisation a été indispensable pour toutes les étapes de ma maîtrise. Il m’a appris à toujours considérer l’applicabilité des résultats de simulations. En me poussant à collaborer et communiquer avec des expérimentateurs, il a permis au projet de rester concret et pertinent.

Je tiens aussi à souligner la collaboration essentielle de Mélina Astolfi, étudiante diplômée à la maîtrise, à une bonne partie de mon projet. Ses réflexions et ses questions sur les effets hydrodynamiques et de diffusion-convection m’ont permis de pousser mes connaissances et de concentrer mes efforts sur les aspects essentiels de ces effets.

De plus, la collaboration avec Mohana Marimuthu, étudiante post-doctorante du groupe, a permis de concentrer la réflexion par rapport aux effets capillaires. Ses questions sur les principes de fonctionnement du dispositif qu’elle a inventé (SIMMS chip) ont été la source de la majeure partie des sections sur la formation de gouttelettes et sur le remplissage de dispositifs microfluidiques.

Merci aussi à l’équipe microfluidique du centre de recherche du CHUM : Euridice Carmona, Benjamin Péant, Mohammed Abdul Lateef, Jennifer Kendall Dupont et Anne-Marie Mes-Masson. Les présentations au CRCHUM tous les trimestres m’ont permis de communiquer mes résultats de simulation à des biologistes travaillant quotidiennement avec des dispositifs microfluidiques et des tumeurs. Les questions et les discussions qu’on a eues ont sans cesse redirigé et aidé à concrétiser chaque facette de mon travail de mémoire.

Je tiens également à remercier Amélie St-Georges Robillard pour son expertise de recherche, son aide pendant mes débuts à la maîtrise et sa rétroaction sur mon mémoire et mes articles. Je remercie aussi Frédéric Monet, mon stagiaire pendant l’été 2014 et l’année scolaire 2015-2016, pour son aide à produire les analyses paramétriques de mon projet.

Enfin, j’aimerais souligner l’importance de la contribution de ma mère, Nihad Ben Salah. Ses relectures, son œil d’experte, ses questions et ses encouragements ont été fondamentaux à l’achèvement de ce projet. C’est grâce aux discussions et disputes qu’on a eues tout au long de mes études que j’ai réussi à garder les pieds sur terre et l’œil sur la ligne d’arrivée.

RÉSUMÉ

Depuis l'essor du domaine de la microfluidique, des dispositifs microfluidiques de tous genres sont analysés, conçus et fabriqués dans plusieurs domaines d'application. Ce projet se concentre sur l'application biomédicale, spécifiquement l'utilisation de dispositifs microfluidiques dans le domaine de la recherche contre le cancer. L'oncologie bénéficierait de ces dispositifs, car ils permettraient d'utiliser un échantillonnage plus restreint pour arriver aux mêmes conclusions que des procédés cliniques dispendieux et encombrants dont la pertinence biologique est remise en question (dans le cas de tests de médicaments en Petri). Les dispositifs en question ont pour but de synthétiser des sphéroïdes cancéreux ou piéger des échantillons de modèles tissulaires 3D tumoraux afin de les exposer à des médicaments et autres traitements, et suivre leur viabilité. Ces dispositifs pourraient un jour intégrer toutes les étapes de l'évaluation du dosage de traitements afin d'accélérer et personnaliser les traitements en oncologie et augmenter le taux de survie des patients atteints de cancer. Dans la littérature à ce sujet, une classe de systèmes microfluidiques répandu et existant dans des formes variables est soulignée et est nommée dans ce travail : « piège microfluidique à échantillons ». Ces dispositifs permettent de simultanément piéger des tissus ou synthétiser des sphéroïdes, de les cultiver, de les exposer à des traitements, de les analyser avec des techniques d'imagerie et de conclure sur l'efficacité des traitements. Cependant, il n'existe toujours pas de cadre analysant le fonctionnement et la conception optimaux de cette classe de dispositif.

L'objectif de ce projet est d'établir un cadre d'analyse rigoureux de la conception et de l'opération optimales de pièges microfluidiques à échantillons (PMÉ). Une analyse paramétrique large des PMÉ est effectuée à partir de leurs géométrie et opération typiques. La géométrie se réduit à un canal principal et une ou plusieurs extrusions cubiques à ce canal (pièges). Le dispositif doit premièrement être rempli avec le milieu de culture. Il est ensuite opéré en circulant les échantillons dans le canal principal pour les piéger avec un mécanisme donné. Une fois les échantillons piégés, le milieu est soit perfusé ou changé à intervalles réguliers pour les maintenir en vie, le temps d'effectuer les tests biologiques. Enfin, les échantillons sont analysés et éjectés du dispositif en le démantelant ou en appliquant un débit assez élevé. Le fonctionnement des PMÉ circonscrit les effets physiques à étudier dans ce projet, soit : (1) la dynamique de remplissage des PMÉ et d'une sous-classe nommée PMÉ à gouttelettes et (2) l'opération des PMÉ; incluant la dynamique de piégeage, le temps pour l'échange du milieu de culture et l'éjection contrôlée des échantillons.

Afin d'atteindre l'objectif de recherche, ces effets physiques sont tout d'abord étudiés analytiquement avec des principes fondamentaux de microfluidique incluant : l'analogie hydraulique-électrique, la capillarité, la dynamique des fluides et le transport de nutriments. La viabilité des modèles tissulaires 3D est définie en fonction des contraintes de cisaillement induites par les fluides (avec une contrainte seuil de $\tau_{max} = 1$ Pa) et de l'appauvrissement en nutriment (avec une concentration seuil de $c_{min} = k_M$ la constante de Michaelis-Menten). Ensuite, pour les effets requérant une analyse plus poussée (piégeage, contraintes de cisaillement, éjection, diffusion-réaction), une suite de simulations numériques est effectuée qui permettent de définir des règles de conception spécifiques à chaque effet étudié. Ces simulations font un balayage paramétrique large de tous les paramètres géométriques et d'opération des PMÉ.

La compatibilité des règles qui découlent des simulations est discutée et la forme optimale d'un PMÉ est définie comme un prisme à base carrée $w \times w$ de hauteur $h \approx 0,9w$ contenant des tissus ayant un diamètre $d \approx 0,7w$. La taille minimale w du dispositif est définie en fonction de la densité des tissus piégés. Les résultats de ce travail établissent les débits optimaux à utiliser dépendamment de la taille des échantillons piégés. Les résultats permettent aussi de trouver le design optimal pour assurer une viabilité des échantillons *in vitro* pendant un certain nombre de jours. Pour la sous-classe des PMÉ à gouttelettes, la taille maximale d'un orifice pour permettre la formation de gouttelettes robustes avec une opération normale du PMÉ est trouvée (< 1 mm). La dépendance de tous ces résultats aux paramètres spécifiques des échantillons est définie et, avec l'utilisation de paramètres biologiques tirés de la littérature, la pertinence des résultats est assurée.

Les résultats de ce travail seront utiles en recherche dans les domaines de (1) la microfluidique (facilite et systématise le design de PMÉ) et (2) des mathématiques appliquées (la méthodologie de simulation utilisée). Les dispositifs développés grâce aux résultats de ce projet seront particulièrement appropriés pour les domaines de (1) la pharmaceutique, car ils permettraient d'effectuer plusieurs essais de traitements avec peu d'échantillons et (2) la recherche clinique, car ils pourraient être utilisés pour des diagnostics et traitements personnalisés.

Mots clés : méthode des éléments finis, hydrodynamique, effets inertiels, portance, piégeage, contrainte de cisaillement, diffusion-réaction, cinétique de Michaelis-Menten, capillarité, remplissage de dispositifs, gouttelettes, sphéroïdes, modèle tissulaire 3D, viabilité, design de systèmes, laboratoires-sur-puce, pièges microfluidiques à échantillons

ABSTRACT

Since the boom of the field of microfluidics, microfluidic devices of all kinds have been analyzed, designed and fabricated in many fields of application. This project focuses on the biomedical application, specifically the usage of microfluidic devices in cancer research. Oncology would benefit from these devices as they would enable using less samples to arrive to the same conclusions as current more expensive and cumbersome clinical processes that have questionable biological relevance (in the case of Petri dish medication assays). These devices are used to synthesize cancer spheroids or to trap 3D tissue model samples with the aim to expose them to medication and other treatments, and to follow the tissue's viability, thus the treatment's efficacy. The devices could one day integrate all steps of evaluating treatment dosage to accelerate and personalize oncology treatments and increase cancer survivability rates. In the literature, a class of microfluidic device that is widely reported on and that exists in various designs is highlighted and named in this research project: "Microfluidic Sample Trap". These devices enable simultaneous trapping of tissues or synthesis of spheroids, cultivating them, exposing them to treatments, analyzing them with various imaging techniques and concluding on the efficacy of the treatments. However, there still lacks a broad and systematic framework analyzing how this class of device works and how it can be optimally designed.

This project's objective is to establish a rigorous framework of optimal microfluidic sample trap (MST) design and operation. A broad parametric analysis of existing MSTs is done from their typical geometry and operation. The geometry of MSTs can be reduced to a main channel and one or many cubic extrusions from this channel (sample traps). The device must be first filled with culture medium. Then, it is operated by circulating samples in the main channel to be trapped with a certain trapping mechanism (inertial confinement, resistive, electrophoretic or sedimentation trapping). Once the samples are trapped, the medium is either perfused or changed periodically to maintain sample viability during biological assays. Finally, samples are analyzed and ejected from the device by either dismantling it or imposing a high enough flowrate. The way MSTs work circumscribes the pertinent physical effects to be studied in this work: (1) the filling dynamics of MSTs and a subclass named droplet MSTs and (2) the operation of MSTs; including trapping dynamics, medium renewal frequency and controlled sample ejection.

To reach the research objective, these physical effects are first studied analytically with fundamental microfluidic principles including: the hydraulic-electric analogy, capillarity, fluid dynamics and nutrient transport. Viability of 3D tissue models is defined as a function of shear stresses induced by fluid flow (with a stress threshold of $\tau_{max} = 1$ Pa) and nutrient depletion (with a concentration threshold of $c_{min} = k_M$ the Michaelis-Menten constant). Afterwards, for the effects requiring an in-depth analysis (trapping, shear stresses, ejection, diffusion-reaction), a series of numerical simulations is carried out to define design rules specific to each of the studied effects. These simulations include broad parametric sweeps of all MST geometric and operating parameters.

The compatibility of rules resulting from these simulations is discussed and the optimal shape of a MST is defined as a square-based ($w \times w$) prism of height $h \approx 0.9w$ containing tissues of a diameter $d \approx 0.7w$. The minimum size w of the device is defined as a function of tissue density. The results in this work establish optimal flowrates to used depending on the sample size. The results also enable finding the optimal design to ensure the *in vitro* viability of samples during a given number of days. For the droplet MST subclass, the maximum size of an opening to ensure a robust droplet formation with a normal operation of the MSTs is found to be under 1 mm. How these results and rules are affected by specific sample parameters is also defined and, by using biological parameters from the literature, the biological relevance of the results is ensured.

The rules resulting from this work will be useful for research in the fields of (1) microfluidics (systemizing and facilitating MST design) and (2) applied mathematics (with the simulation methodology used in this work). Devices developed with these results will be particularly appropriate in the fields of (1) pharmaceutical research, as it would enable high-throughput treatment assays with minimal samples and (2) clinical research, as it could be used for personalized medicine, diagnostics and treatments.

Keywords : finite element method, hydrodynamics, inertial effects, lift force, trapping, shear stress, diffusion-reaction, Michaelis-Menten kinetics, capillarity, device filling, hanging drop method, spheroid, 3D tissue models, viability, system design, lab-on-a-chip, microfluidic sample trap.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	III
REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ.....	V
ABSTRACT	VII
TABLE DES MATIÈRES	IX
LISTE DES TABLEAUX.....	XII
LISTE DES FIGURES	XIII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	XIX
LISTE DES ANNEXES	XX
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 2 REMPLISSAGE DE SYSTÈMES MICROFLUIDIQUES	9
2.1 Analogie hydraulique-électrique	9
2.1.1 Remplissage d'un PMÉ	11
2.1.2 Unité de base d'un PMÉ à gouttelettes	12
2.2 Modèle capillaire de formation de gouttelettes	14
2.2.1 Dimensions critiques	15
2.2.2 Pression hydrostatique critique	16
2.2.3 Débit critique	18
CHAPITRE 3 OPÉRATION DE SYSTÈMES MICROFLUIDIQUES	22
3.1 Dynamique des fluides	23
3.1.1 Dynamique de piégeage	25
3.1.2 Contrainte de cisaillement	29
3.1.3 Portance et éjection des tissus	33

3.2	Diffusion-réaction	37
3.2.1	Nutriments continuellement réapprovisionnés	39
3.2.2	Nutriments réapprovisionnés par le milieu	41
3.3	Viabilité d'un modèle tissulaire 3D.....	44
3.3.1	Effet de la contrainte de cisaillement	46
3.3.2	Effet de l'appauvrissement en nutriments	47
CHAPITRE 4	ARTICLE 1 : SIMULATION-ASSISTED DESIGN OF MICROFLUIDIC SAMPLE TRAPS FOR OPTIMAL TRAPPING AND CULTURE OF NON-ADHERENT SINGLE CELLS, TISSUES, AND SPHEROIDS	52
4.1	Présentation de l'article	52
4.2	Simulation-assisted design of microfluidic sample traps for optimal trapping and culture of non-adherent single cells, tissues, and spheroids	53
4.2.1	Finite element methodology	56
4.2.2	Numerical models and results	63
4.2.3	Discussion	69
4.2.4	Conclusion.....	72
4.2.5	References	73
4.2.6	Acknowledgements	76
4.2.7	Author Contributions.....	76
4.2.8	Additional information.....	77
CHAPITRE 5	DISCUSSION GÉNÉRALE	78
5.1	Synthèse des règles de conception	78
5.1.1	Règles pour le remplissage de dispositifs	78
5.1.2	Règles pour le design et le débit appliqué.....	79
5.1.3	Règles pour le temps d'échange du milieu.....	81

5.2	Remplissage et opération de PMÉ à gouttelettes	82
5.3	Limitations de la méthodologie	84
CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS		85
BIBLIOGRAPHIE		87
ANNEXES		96

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2-1 : Composants microfluidiques et leur équivalent électrique	10
Table 4-1: Tissue uptake parameters found in literature for various cell types and the typical value used in the models	58
Table 4-2: Device width w and height h compared to tissue diameter d to optimize device operation	69
Table 4-3: Comparing device design and operation for specific tissue densities	70
Table 4-4: Comparing experimental and model replenishment times t_{rep} for several publications	71
Tableau 5-1 : Opération de dispositifs à gouttelettes	79
Tableau 5-2 : Comparaison du temps théorique d'échange du milieu suggéré par les simulations (Temps théo. t_{dep}) au temps expérimental rapporté dans certains articles (Temps exp.)	81

LISTE DES FIGURES

Figure 1-1 : Schéma des modèles tissulaires 3D en ordre croissant de pertinence biologique. Les modèles *in vitro* comprennent les méthodes standard de culture (1) en suspension de cellules et (2) en Pétéri, les méthodes plus récentes de culture (3) en couche multicellulaire et (4) en fibre creuse [6] et (5) la méthode de culture de sphéroïdes [7]. Les modèles *ex vivo* comprennent les méthodes qui extraient des tissus d'organismes, notamment (6) la méthode de tumeurs micro-disséquées (TMD) [8]. Les modèles *in vivo* incluent (7) la méthode standard de xénogreffe où les cellules sont cultivées dans un spécimen vivant (typiquement des souris) et (8) seraient, dans un cas non envisageable d'un point de vue éthique, d'effectuer des essais de concentration de médicaments directement chez le patient.....1

Figure 1-2 : PMÉ qui exploitent le mécanisme de piégeage et confinement inertiel, de piégeage résistif, de piégeage par électrophorèse, de piégeage par sédimentation et qui exploitent le principe de microfluidique ouverte (ou pièges microfluidiques à échantillon à gouttelettes). 3

Figure 1-3 : Géométrie du piège microfluidique à échantillon typique et opération typique sujet de l'analyse dans ce mémoire. (1) Le piège est un prisme à base carrée $w \times w$ et de hauteur h . Le tissu piégé est supposé sphérique de diamètre d . Le canal associé à un piège a une longueur L et une coupe transversale A . (2) Le tissu est chargé dans le dispositif et piégé à l'aide d'un débit de fluide à l'entrée, c'est la phase de piégeage ou de chargement des échantillons. (3) Le tissu est cultivé, traité, tâché et analysé tout en restant piégé; les débits à l'entrée sont utilisés pour échanger le milieu de culture et perfuser des médicaments ou marqueurs fluorescents. (4) Le tissu peut être éjecté du dispositif avec un débit assez élevé.4

Figure 1-4 : Méthodologie générale de la méthode des éléments finis. (1) Dessin de la géométrie dans le logiciel au choix. (2) Définition des phénomènes physiques, conditions aux frontières et dans les domaines. (3) Maillage du domaine à résoudre dans le logiciel au choix. (4) Résolution du problème avec le logiciel au choix. (5) Présentation des résultats des simulations.6

Figure 1-5 : Organigramme du travail présenté dans ce mémoire. Les composants du mémoire sont présentés : les concepts et méthodes utilisés sont en bleu, les contributions à des articles sont en rouge et les sections du mémoire sont en jaune. Le but de la recherche présentée dans le cadre du mémoire est placé au centre en brun. Trois sections sont démarquées avec des

pointillés : en vert le principe de conception pour l'opération de PMÉ, en rouge le principe de conception pour le remplissage de PMÉ et en blanc le résumé des règles de conception.7

Figure 2-1 : Remplissage d'un PMÉ de base dont les canaux ont une résistance hydraulique R_c avec une résistance d'entrée R_e et une résistance de sortie R_s (résistances dues à des tubes d'entrée et de sortie du dispositif microfluidique). La pression d'entrée ΔP_e permet de remplir le dispositif et la pression capillaire ΔP_c du front capillaire dépend de l'hydrophobicité du matériau.11

Figure 2-2 : Image d'un PMÉ à gouttelettes avec l'unité de base hydraulique représentée. Trois modes d'opération sont présentés : remplissage du canal (1) principal, (2) secondaire et (3) les deux simultanément. Les fronts capillaires immobiles sont schématisés par des diodes Zener. Les fronts capillaires mobiles sont schématisés par des sources de pression. Les résistances de canaux en remplissage sont variables.13

Figure 2-3 : Définition des grandeurs de l'équation (2-6) sur une coupe transversale pour retrouver r_{cap} . Un deuxième r_{cap} est défini sur un plan orthogonal à cette coupe. À gauche, le cas d'un front capillaire hydrophobe où $r_{cap} < 0$; à droite un front capillaire hydrophile. La flèche dicte la direction de la force ressentie par le fluide.14

Figure 2-4 : Schéma d'un puits à gouttelette avec une pression hydrostatique aux entrées telle que $P_{in} = \rho g h_e$. Schéma de formation de gouttelette : la plus cohésive est en bleu opaque et la limite de mouillage d'une gouttelette est en bleu transparent.17

Figure 2-5 : Pression capillaire de la goutte P_g normalisée par la pression capillaire critique de fuite ΔP_{g-f} en fonction du rayon de la goutte r_g normalisée par le rayon hydraulique de l'orifice r_{hyd} . Les schémas d'une goutte stable $P_1 < \Delta P_{g-f}$, limite $P_1 = \Delta P_{g-f}$ et instable $P_1 > \Delta P_{g-f}$ sont présentés. Les configurations (2) et (3) ont une pression et un rayon de courbure identiques.18

Figure 2-6 : Schéma électrique de N pièges à gouttelette en série. La pression à l'entrée ΔP_e peut être remplacée par un débit à l'entrée Q_e . La pression la plus élevée est P_1 au premier orifice. La pression du front capillaire est ΔP_c dans le canal reliant les pièges. Chaque piège est une diode Zener de pression d'opération inverse P_{cap} et de pression d'opération directe $P = 0$,

- car le dispositif est considéré comme hydrophobe. Le dispositif est exposé à l'air (pression atmosphérique P_{atm}).19
- Figure 3-1 : Colorant permettant de voir les lignes de flux autour d'un cylindre dans l'eau entre deux plaques séparées de 1 mm pour un régime visqueux $Re \ll 1$ (A) et un régime inertiel $Re \gg 1$ (B) [46].24
- Figure 3-2 : Schéma des effets hydrodynamiques de l'opération d'un PMÉ avec un débit Q . (1) Le chargement des tissus se fait en deçà du débit d'éjection des tissus Q_{lift} (défini à la section 3.1.3) afin d'assurer la stabilité du piégeage. (2) Le piégeage exploite une des forces volumiques listées dans l'introduction pour tirer le tissu dans le piège, si la force de piégeage est faible (ex. gravité), Q doit être nul pour permettre le piégeage. (3) L'opération du dispositif (chargement des tissus et renouvellement du milieu de culture) se fait en deçà de Q_{lift} et du débit critique de cisaillement Q_{shear} (défini à la section 3.1.2) afin d'assurer la viabilité des tissus (définie à la section 3.3). (4) L'éjection des tissus se fait avec un débit en deçà de Q_{shear} et au-delà de Q_{lift}25
- Figure 3-3 : Schéma des effets à étudier pour la dynamique de piégeage d'un tissu sphérique de diamètre $d = 2r$ et de densité ρ_T . Pour l'effet des parois, le tissu est considéré loin du fond dans un piège cylindrique de diamètre D . Pour l'effet du fond, le tissu est placé à une hauteur h du fond. Le piège est rempli d'un fluide de densité ρ_F et de viscosité η . Ces effets entrent en compte aux étapes 1 et 2 schématisées à la Figure 3-2.27
- Figure 3-4 : Comparaison des facteurs de correction à la vitesse terminale de sédimentation dans un piège cylindrique en fonction du ratio d/D pour l'approximation d'Haberman, de Francis et pour les solutions de simulations numériques28
- Figure 3-5 : Correction k de la vitesse de sédimentation en fonction du ratio hr caractéristique de la distance entre la paroi et le centre du tissu sphérique; $hr = 1$ implique que le tissu est collé à la paroi29
- Figure 3-6 : Schéma de l'effet de la contrainte de cisaillement dans une configuration expérimentale pire cas : un tissu piégé fixe assez gros pour que son point le plus haut soit soumis à des vitesses du fluide similaires à celles dans le canal principal. Le gradient de vitesse du fluide génère une contrainte de cisaillement à la surface du tissu qui peut l'endommager

- (concept expliqué à la section 3.3.1). Cet effet entre en compte aux étapes 3 et 4 schématisées à la Figure 3-2.30
- Figure 3-7 : Coupe transversale d'un canal rectangulaire. Tracé de contours de la solution de l'équation de Navier-Stokes dans le régime laminaire (a) avec le profil maximum sur l'axe y (b) et z (c). Le point de contrainte maximale est marqué d'une croix rouge. Les paramètres h et w utilisés à l'équation (3-6) sont définis à cette figure. Tirée de [43].31
- Figure 3-8 : Schéma de l'effet de portance étudié. Lors de l'opération du dispositif, assurer la stabilité du piégeage veut dire de garder le débit en deçà du débit d'éjection Q_{lift} . Cet effet entre en compte aux étapes 1, 3 et 4 schématisées à la Figure 3-2.33
- Figure 3-9 : Validité de l'équation de Bernoulli : taille minimale w_{min} pour que l'équation de Bernoulli s'applique avec un nombre de Reynolds cible de 1, 10 et 100 dépendamment de la densité relative du tissu $\rho T \rho$. Un tissu épithélial typique a une densité relative autour de 1,02 (1) [22] à un maximum de 1,05 (2) [61], un tissu musculaire jusqu'à 1,06 (3) [62]. La levure, un organisme unicellulaire typique, a une densité relative allant jusqu'à 1.1 (4) [63].36
- Figure 3-10 : Schéma des effets de diffusion-réaction à simuler. À la section 3.2.1, la diffusion de nutriments continuellement réapprovisionnés (ex. O_2 en jaune dans la figure) à travers les parois du dispositif et dans le milieu. À la section 3.2.2, la diffusion de nutriments réapprovisionnés par le milieu (ex. glucose en vert dans la figure) à travers le milieu et nécessitant un renouvellement du milieu de culture.39
- Figure 3-11 : Schéma 3D du dispositif simplifié réduit à un problème de diffusion 1D de coupe transversale A et de longueur L_2 pour étudier la diffusion de nutriments disponibles dans le canal42
- Figure 3-12 : Exemple type d'un essai par Annexin V/iodure de propidium pour déterminer le nombre de cellules en santé (quadrant en bas à gauche), en apoptose précoce (quadrant en bas à droite), en apoptose tardive (quadrant en haut à gauche) et mortes (quadrant en haut à droite) [71]. L'axe des abscisses présente l'expression de l'annexine V et l'axe des ordonnées présente l'expression du PI. Figure reproduite avec permission.....45
- Figure 3-13 : Voies principales du métabolisme énergétique qui considèrent le glucose, le lactate et l'oxygène. En manque d'oxygène, le glucose excédant est emmagasiné sous forme de

lactate. En manque de glucose, le lactate emmagasiné est consommé. Le lactate n'est pas critique au métabolisme énergétique. Tiré de [86] et reproduit avec permission.48

Figure 3-14 : Phases du cycle de division cellulaire. Les durées typiques de chaque phase sont données pour des cellules mammaliennes pour 24 heures au total. *S* = phase de synthèse d'ADN, *M* = mitose, *G1* et *G2* sont des phases de suspension ou de « gap », *G0* = état de quiescence (sans division) « dormant » où les cellules peuvent rester indéfiniment. Reproduit avec permission.49

Figure 3-15 : Schéma de modélisation de la croissance d'un tissu. Les métabolites (oxygène, glucose et lactate) sont consommés à un certain taux Q . Ce taux donne directement le taux de génération de l'ATP Q_{ATP} [88]. Le taux de génération d'ATP est traduit en une multiplication ou une mort cellulaire. Dépendamment du sort de la cellule, le volume du tissu croît ou décroît.50

Figure 4-1: Basic MST designs: (A) MST operation with schematics of different trapping mechanisms: resistive, dielectrophoretic, inertial and sedimentation trapping; blue axis is parallel to gravity. The picture of the western hemisphere of earth on a transparent background was solely created by NASA and is in the public domain in the United States. (B) Simplified 3D (a) and 2D (b) MST design with a top (c) and side (d) view of a PDMS chip with these features; scale bar is 1 000 μm55

Figure 4-2: MST simulation methodology: (A) Sample traps operation schematic: (1) trapping of a tissue, spheroid or cell suspensions using any trapping mechanism (typically with volume forces), (2) culture, growth, treatment and in-vitro analysis of the tissues, and (3) release, ejection or collection of the samples from the traps for external analysis (e.g. flow cytometry). (B) Characteristic dimensions of the device with: L the inter-well separation, A the channel cross-section, V the available medium volume per well, d the tissue diameter (assuming a spherical tissue), w the well size (assuming a square well) and h the well depth. (C) Degrees of freedom for designing the device: (a) scaling the device up and down while keeping the tissue size constant compared to the well size, (b) scaling the tissue size while keeping all other dimensions constant, (c) scaling the trap height while keeping all other dimensions constant, and (d) scaling the available medium volume per well while keeping all other

dimensions constant (inset shows the 1D simplification of the device for analysing diffusion of metabolites).....59

Figure 4-3: Hydrodynamic numerical results **(A)** Settling time as a function of the ratio of tissue diameter d over trap width w (as pictured in the inset) for two well cross-sections (cylindrical and square) compared to the analytical approximation by Haberman *et al*³². Settling distance over a height of w (cubic well) for tissues 2% heavier than water. **(B)** Streamlines (red lines), flow velocity colour map mms in the well around the tissue, and shear stress greyscale map Pa on the tissue with the net resulting force of the flow on the tissue (red arrow) for a flow rate generating tissue lift Q_{lift} **(a)** and generating damaging shear stresses Q_{shear} **(b)**. Phase diagram representation of critical flow rates for tissue ejection Q_{lift} and tissue shearing Q_{shear} for **(C)** varying trap width (or device scale) with a constant ratio $dw = 0.5$ and $w = h$ (result of ~5,800 simulations), **(D)** varying diameter over trap width ratios with $w = h = 0.5$ mm (result of ~4,300 simulations) and **(E)** varying trap height with a constant ratio $dw = 0.5$ and $w = 0.5$ mm (result of ~1250 simulations).63

Figure 4-4: Spatial distribution of metabolites for $VMVT \approx 300$, $d = 375 \mu\text{m}$ and $w = 750 \mu\text{m}$ **(A)** Colour mapping of the distribution of **(a)** oxygen in a full PDMS device, **(b)** oxygen in a PDMS device set on a glass slide, **(c)** glucose after 3 days, and **(d)** glucose after 87 hours; all normalized by the saturation concentration. **(B)** Distribution of various nutrients through the tissue and their associated Michaelis-Menten constants. **(C)** Time in hours before the minimum concentration of glucose in the tissue dips under the Michaelis-Menten constant, indicating a possibility in affecting cell metabolism as a function of the ratio of available volume per well on tissue volume (result of ~4,000 simulations). **(D)** Schematic of different available medium volume per well VM on tissue volume VT ratios.....67

Figure 5-1 : Intersection entre le remplissage et l'opération de PMÉ à gouttelettes. **(A)** Les débits maximums de fuite Q_{max} et **(B)** le temps de remplissage avec un débit égal à 50 % de Q_{max} pour un dispositif parfaitement hydrophile 0° , hydrophobe 180° et ni l'un ni l'autre 90° en fonction du nombre de gouttelettes en série N . Le débit critique de cisaillement des tissus et d'éjection des tissus pour les dimensions. **(C)** Photo d'un exemple de PMÉ à gouttelettes compatible avec une plaque microtitre à 96 puits (reproduite avec la permission d'Amélie St-Georges Robillard).83

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

PDMS	Polydimethylsiloxane
PMMA	Poly(methyl methacrylate)
PMÉ	Piège microfluidique à échantillons (Microfluidic Sample Trap ou MST)
MFN	Méthodes des fluides numériques (Computational Fluid Dynamics ou CFD)
MÉF	Méthode des éléments finis (Finite Element Method ou FEM)
ÉDP	Équation aux dérivées partielles
ρ_{cell}	Densité cellulaire volumique d'un tissu en nombre de cellules par m^3 : $[\text{cells}/\text{m}^3]$
ρ	Densité volumique de masse d'un milieu : $[\text{kg}/\text{m}^3]$
η	Viscosité dynamique d'un milieu : $[\text{Pa} \cdot \text{s}]$
γ	Tension de surface : $[\text{N}/\text{m}]$

LISTE DES ANNEXES

Annexe A – Méthodologie d'utilisation du logiciel COMSOL Multiphysics® pour effectuer des balayages paramétriques et des mesures de forces réactives	96
Annexe B – Résultats à paraître dans l'article de Mohana Marimuthu.....	107

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

Dans la recherche contre le cancer, le temps d'attente entre le dépistage d'une anomalie, le diagnostic et les tests de médicaments (ou les chirurgies) varie beaucoup. Selon le rapport de 2008 du Réseau canadien du cancer du sein [1], ce temps dépasse fréquemment trois mois. Diagnostiquer un cancer et évaluer l'efficacité d'un médicament prend beaucoup de temps à cause des limites des techniques utilisées. Il n'existe pas de marqueur biologique spécifique aux cellules cancéreuses et évaluer la présence de ces cellules dans une biopsie requiert des résultats de cultures cellulaires 2D dont la pertinence biologique est remise en question et demande l'expertise d'oncologues spécialisés [2]. Ainsi, la difficulté d'obtenir des diagnostics personnalisés à faibles coûts conduit à une perte de temps précieux liée à la prescription de médicaments parfois inefficaces [3]. Un domaine en plein essor offrant une solution prometteuse à ces problématiques est celui des laboratoires-sur-puce qui exploite la microfluidique afin d'intégrer certaines fonctions d'un laboratoire dans un dispositif en deçà de la taille d'une lame de microscope. Certains de ces dispositifs permettent de simultanément synthétiser des modèles tissulaires 3D et les exposer à des médicaments. Les modèles tissulaires 3D se placent dans un spectre de pertinence biologique allant des cultures 2D de cellules, aux tissus humains *in vivo* [4], [5] (Figure 1-1).

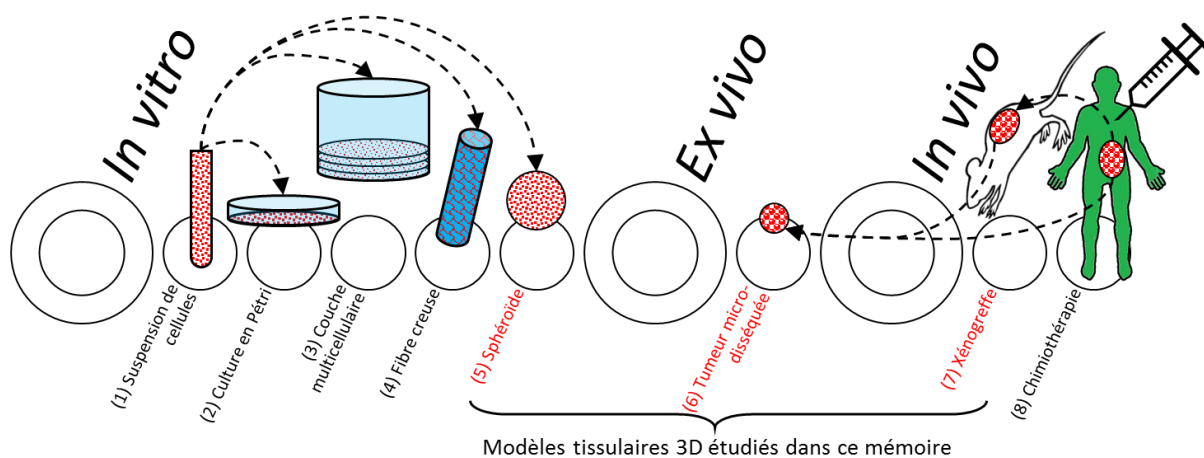


Figure 1-1 : Schéma des modèles tissulaires 3D en ordre croissant de pertinence biologique. Les modèles *in vitro* comprennent les méthodes standard de culture (1) en suspension de cellules et (2) en Péttri, les méthodes plus récentes de culture (3) en couche multicellulaire et (4) en fibre creuse [6] et (5) la méthode de culture de sphéroïdes [7]. Les modèles *ex vivo* comprennent les méthodes qui extraient des tissus d'organismes, notamment (6) la méthode de tumeurs micro-disséquées

(TMD) [8]. Les modèles in vivo incluent (7) la méthode standard de xénogreffe où les cellules sont cultivées dans un spécimen vivant (typiquement des souris) et (8) seraient, dans un cas non envisageable d'un point de vue éthique, d'effectuer des essais de concentration de médicaments directement chez le patient.

Les dispositifs microfluidiques spécialisés (laboratoires-sur-puce) [9] et les échantillons 3D synthétisés sur puce (sphéroïdes), provenant de xénogreffes ou de biopsies de patients (TMD) [10] gagnent en popularité dans la recherche biologique. Cette solution permettrait d'effectuer des diagnostics plus rapides et des dosages de médicaments plus personnalisés puisqu'une centaine d'échantillons en deçà du microlitre peuvent être extraits à partir d'une biopsie et utilisés simultanément pour tester une sélection de médicaments. Le dispositif microfluidique en question est le **piège microfluidique à échantillons** (PMÉ) qui a comme particularité de pouvoir soit piéger des tissus ou synthétiser des sphéroïdes qui sont par la suite cultivés, traités, analysés et imagés dans le piège. Plusieurs designs de PMÉ de complexité variable ont été développés par des chercheurs-biologistes et ingénieurs. La complexité de ces dispositifs provient du mécanisme de piégeage, mais, dans sa forme la plus simple, le design se réduit au schéma de la Figure 1-3. Il existe plusieurs mécanismes ou combinaisons de mécanismes de piégeage d'échantillons (énumérés ici-bas) qui peuvent être utilisés dans les PMÉ.

(1) Le mécanisme le plus populaire comprend **des pièges résistifs** [11]–[16] qui exploitent l'écoulement préférentiel des fluides dans des canaux ayant une résistance hydraulique moindre pour piéger les tissus. Une fois le piège occupé, la résistance du canal du piège augmente au-delà de celle d'un canal de déversement et les tissus sont dirigés vers le piège suivant.

(2) Le mécanisme de **piégeage inertiel** [17]–[19] est plus systématique, mais requiert un design bien ajusté et une manipulation minutieuse pour fonctionner correctement. Ce mécanisme utilise des débits élevés générant des écoulements de transition (entre laminaire et turbulent) pour piéger des tissus ou les confiner à des espaces restreints du dispositif.

(3) Le mécanisme de **piégeage par électrophorèse** [20], [21] exploite la différence de permittivité diélectrique entre les tissus à piéger et le milieu transporteur pour piéger les tissus avec un champ électrique externe.

(4) Le mécanisme de **piégeage gravitationnel (ou par sédimentation)** [22]–[25] est le plus facile à construire et opérer. Les tissus sont amenés au-dessus des pièges et sont piégés après un

moment d'attente pouvant varier de quelques secondes à quelques minutes dépendamment de la taille des pièges et de la taille et densité volumique du tissu à piéger. Un design facile à opérer de ce type de PMÉ a été développé par Mélina Astolfi [8].

(5) Une variation sur le mécanisme de piégeage gravitationnel utilise le **principe de microfluidique ouverte** [26], [27] (connu sous le nom anglais de *Open Microfluidics*). Cette méthode facilite l'étape de remplissage du dispositif, car elle exploite les propriétés de surface du matériau de fabrication pour générer les pièges qui sont simplement des gouttelettes. Un nouveau type de dispositif, nommé « Single Inlet Multi-Size Spheroid Synthesis Chip » ou « SIMSS Chip », qui exploite ce mécanisme a été développé par Mohana Marimuthu [26] et est inspiré d'un dispositif développé par Olivier Frey et al. [27]. Dans ce mémoire, ce dernier mécanisme est nommé « PMÉ à gouttelettes », car il se démarque des autres types par un effet de tension de surface supplémentaire (soit la formation de gouttelette et la dynamique de remplissage du dispositif).

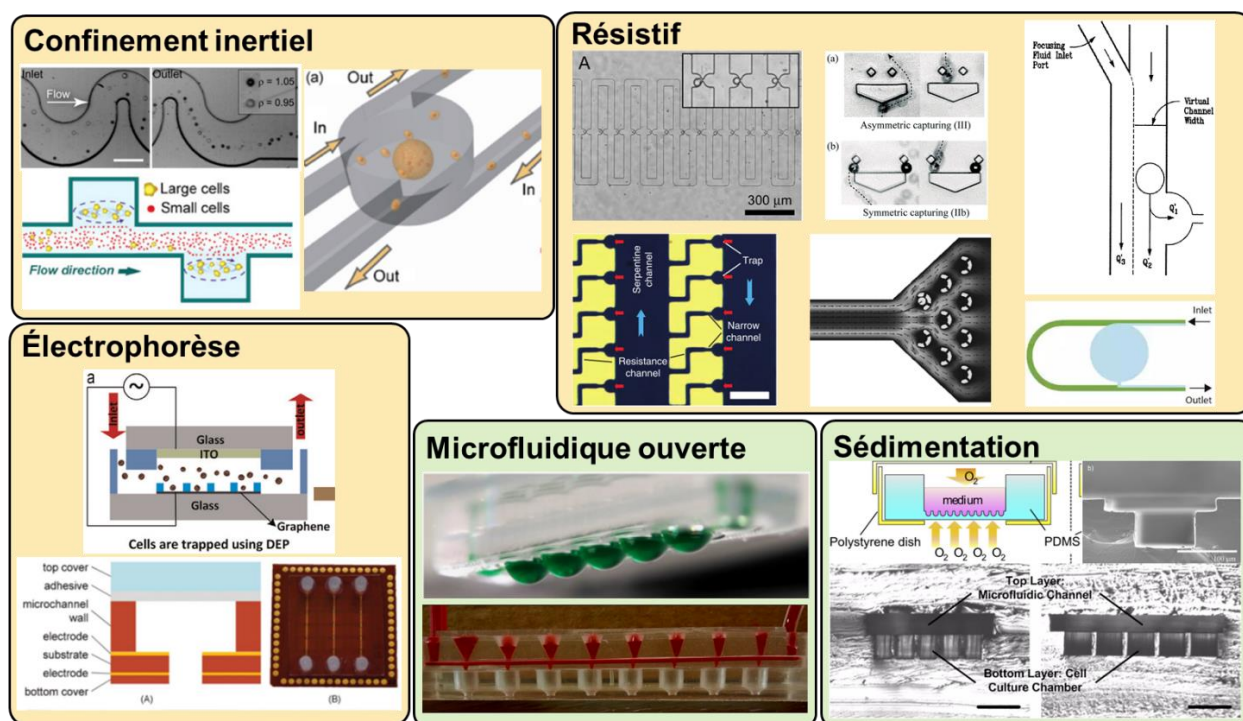


Figure 1-2 : PMÉ qui exploitent le mécanisme de piégeage et confinement inertiel, de piégeage résistif, de piégeage par électrophorèse, de piégeage par sédimentation et qui exploitent le principe de microfluidique ouverte (ou pièges microfluidiques à échantillon à gouttelettes).

Les PMÉ étudiés sont supposés être fabriqués avec du polydiméthylsiloxane (PDMS), car c'est un matériau bon marché, transparent, perméable à certains nutriments (ex. oxygène), flexible et facile à utiliser. La Figure 1-2 présente quelques exemples de chacun des mécanismes utilisés dans les PMÉ, il existe aussi d'autres mécanismes de piégeage (optique, acoustique ou avec valves) ou des combinaisons de ceux présentés ci-dessus.

Généralisation des pièges microfluidiques à échantillon

Le design d'un PMÉ est réductible à une géométrie simple où un canal principal transporte des échantillons (biologiques ou autres) vers un piège qui les protège du débit dans le canal (Figure 1-3). Le piégeage dans un PMÉ est réduit aux mécanismes qui exploitent des forces volumiques agissant sur l'entière du tissu pour le piéger dans un puits à partir du canal principal. Les PMÉ permettent de manipuler des cellules, des sphéroïdes et des tissus sous-millimétriques de façon pratique et reproductible. Une fois piégés, ces échantillons sont cultivés, exposés à des médicaments et soumis à une foule de tests. Enfin, les échantillons peuvent être éjectés avec des débits suffisamment élevés ou recueillis en démantelant le dispositif.

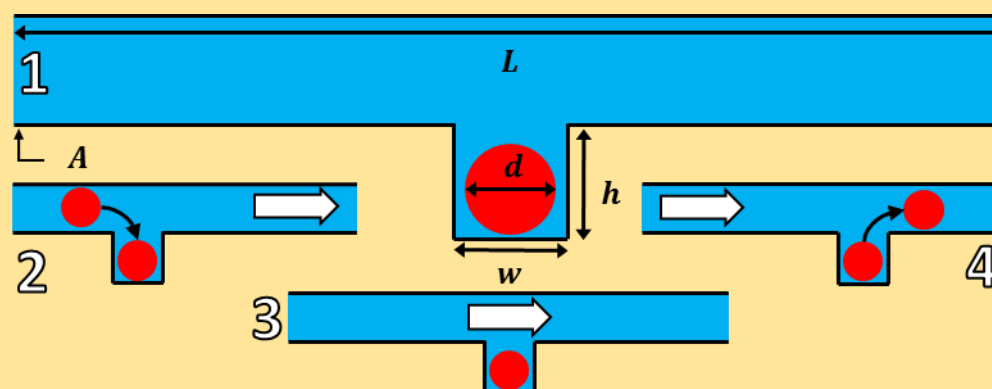


Figure 1-3 : Géométrie du piège microfluidique à échantillon typique et opération typique sujet de l'analyse dans ce mémoire. (1) Le piège est un prisme à base carrée $w \times w$ et de hauteur h . Le tissu piégé est supposé sphérique de diamètre d . Le canal associé à un piège a une longueur L et une coupe transversale A . (2) Le tissu est chargé dans le dispositif et piégé à l'aide d'un débit de fluide à l'entrée, c'est la phase de piégeage ou de chargement des échantillons. (3) Le tissu est cultivé, traité, tâché et analysé tout en restant piégé; les débits à l'entrée sont utilisés pour échanger le milieu de culture et perfuser des médicaments ou marqueurs fluorescents. (4) Le tissu peut être éjecté du dispositif avec un débit assez élevé.

Objectifs de la recherche

L'objectif principal de ce projet de recherche est de consolider la conception et la manipulation de pièges microfluidiques à échantillons (PMÉ) en utilisant des modèles analytiques et des simulations numériques. Les concepts de capillarité, de diffusion-réaction et d'hydrodynamiques sont au cœur du projet. La capillarité permet d'étudier le remplissage de dispositifs microfluidiques et la formation de gouttelettes sur puce. La diffusion-réaction permet d'étudier la dynamique de transport de nutriments dans un PMÉ à travers le PDMS, le milieu de culture et le modèle tissulaire 3D d'intérêt. L'hydrodynamique permet d'étudier l'interaction entre un liquide en mouvement et le tissu piégé dans le PMÉ notamment la dynamique de piégeage, les contraintes de cisaillement dues au débit et la portance ressentie par des échantillons piégés. Tous ces concepts, liés à l'opération typique de PMÉ (sous-figures 2 à 4 de la Figure 1-3), sont affectés par les paramètres géométriques du PMÉ typique (sous-figures 1 de la Figure 1-3).

Méthodologie

Pour atteindre l'objectif de ce projet, ces trois concepts de base sont étudiés d'abord par des modèles analytiques puis, pour les concepts qui le requièrent, par simulation numérique. L'outil utilisé pour les simulations numériques est *COMSOL Multiphysics*® exploité avec une licence louée à *CMC Microsystems*. *COMSOL Multiphysics*® est un logiciel de simulation numérique qui utilise la méthode des éléments finis (MÉF) pour résoudre des problèmes complexes. Ce logiciel permet d'effectuer une analyse paramétrique large sur les paramètres géométriques et opérationnels des PMÉ (Figure 1-3) avec sa fonction *Parametric Sweep*. De plus, les opérateurs incorporés dans le logiciel, tels que les opérateurs d'intégration, de somme, de maximum/minimum et de force réactive, sont indispensables pour résoudre de façon efficace les problèmes d'intérêt. Le logiciel permet aussi d'effectuer toutes les étapes de la méthode des éléments finis dont la méthodologie générale est présentée à la Figure 1-4. La méthodologie d'utilisation du logiciel *COMSOL Multiphysics*® et de ses fonctions clés pour effectuer des balayages paramétriques est présentée à l'annexe B.

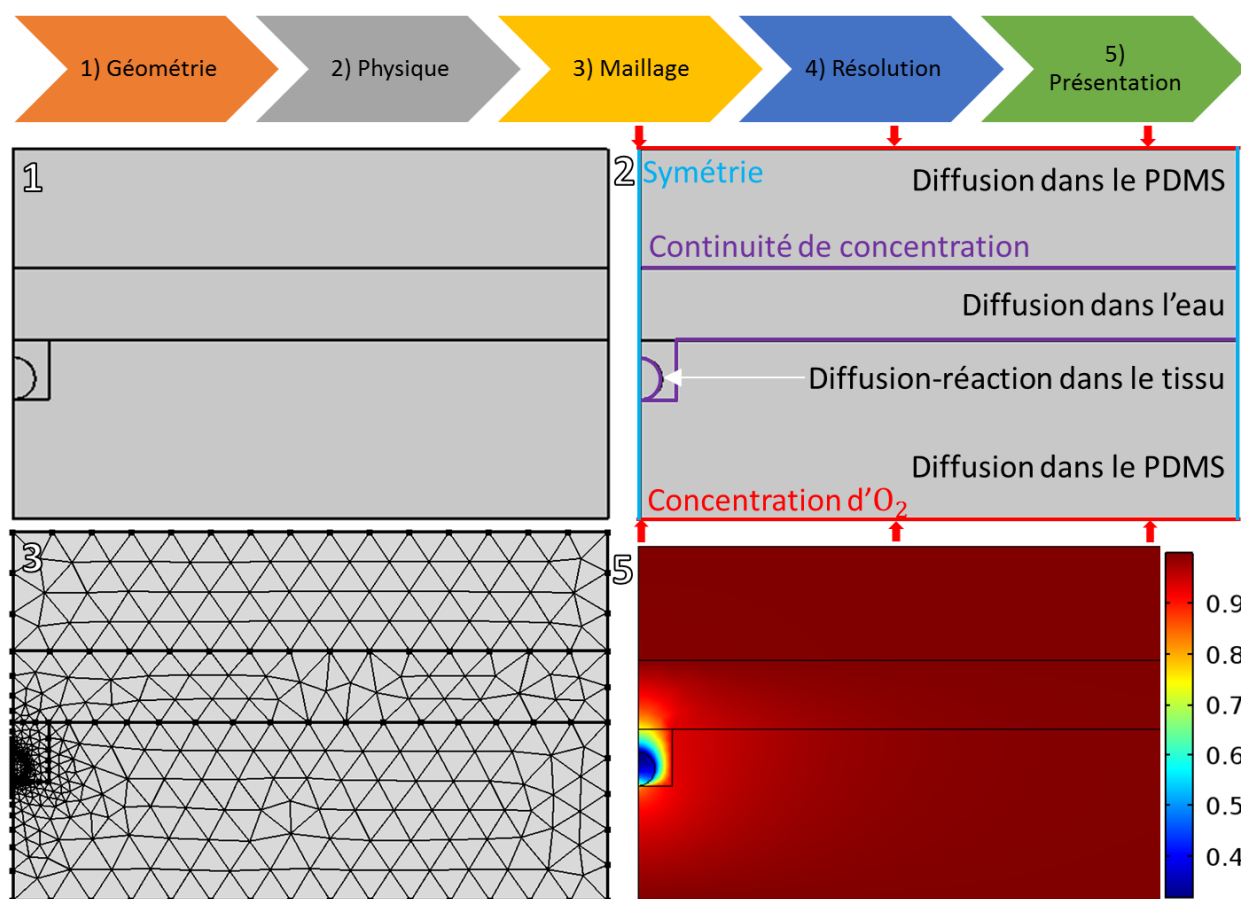


Figure 1-4 : Méthodologie générale de la méthode des éléments finis. (1) Dessin de la géométrie dans le logiciel au choix. (2) Définition des phénomènes physiques, conditions aux frontières et dans les domaines. (3) Maillage du domaine à résoudre dans le logiciel au choix. (4) Résolution du problème avec le logiciel au choix. (5) Présentation des résultats des simulations.

Analyse paramétrique : paramétrisation avec *COMSOL Multiphysics*®

La paramétrisation peut s'effectuer sur : (1) les paramètres géométriques, en modifiant la taille ou la présence de caractéristiques (ex. taille du tissu); (2) la physique, en modifiant la valeur de paramètres ou en enlevant des aspects (ex. concentration d'O₂ dans l'air, enlever l'apport par le bas du dispositif); (3) le maillage, en le raffinant ou en le rendant plus grossier; (4) la résolution en établissant des paramètres d'arrêt qui interrompent le solveur lorsqu'une valeur critique est atteinte. Dans cette étude, la paramétrisation est faite sur les paramètres géométriques, le débit de fluide et en arrêtant le solveur à des valeurs critique de viabilité des tissus. Cette paramétrisation est décrite plus en détail dans l'article soumis pour publication présenté au Chapitre 4.

Impact

Malgré la publication de plus en plus de designs de PMÉ, il n'existe pas de cadre systématique décrivant la conception optimale de ces dispositifs. Ce travail établit ce cadre en étudiant avec des simulations numériques les aspects physiques régissant l'opération des PMÉ : le remplissage des dispositifs, la dynamique de piégeage, les contraintes de cisaillement, les forces d'éjection et l'apport en nutriment dans le dispositif. Ce type de résultat est utile en recherche fondamentale et appliquée dans les domaines de la microfluidique (facilite et systématise le design de PMÉ). Les PMÉ ont un fort potentiel dans (1) la recherche pharmaceutique, car ils sont une solution pratique pour effectuer des tests de médicament sur une large échelle avec peu d'échantillons et (2) la recherche clinique (particulièrement en oncologie), car ils sont un excellent outil pour la transition vers des diagnostics et traitements personnalisés.

Les contributions scientifiques de ce projet sont multiples. Les modèles de l'étude des effets de diffusion-réaction dans des PMÉ et des effets hydrodynamiques sur les échantillons piégés ont été appliqués directement à un dispositif publié par Astolfi et al. [22]. Les modèles de l'étude du remplissage du dispositif et des effets capillaires seront soumis prochainement dans un article écrit par Marimuthu et al. (figures présentées à l'annexe C). Les résultats des règles de conception de PMÉ ont été soumis pour publication au journal *Scientific Reports* par l'auteur du mémoire (Chapitre 4). Enfin, les résultats de simulation de ce mémoire ont été présentés par Mélina Astolfi [10], Thomas Gervais [28], Mohana Marimuthu [26] et Mohammed Abdul Lateef [29] dans des conférences internationales.

CHAPITRE 2 REMPLISSAGE DE SYSTÈMES MICROFLUIDIQUES

Ce chapitre résume les effets de remplissage de PMÉ. Cet aspect a été étudié principalement dans le cadre du dispositif inventé par Mohana Marimuthu, étudiante post-doctorante du laboratoire de Thomas Gervais. Le résultat de ces analyses contribuera à la publication d'un article (figures présentées à l'annexe C) et a été présenté en partie par Mohana Marimuthu [26] dans une conférence internationale. La dynamique de remplissage et les limites d'opération d'un PMÉ à gouttelettes sont étudiées. Les circuits d'intérêt sont composés de composantes simples, mais requièrent une étude dynamique du remplissage.

Avec des matériaux hydrophobes et des géométries comportant des coins, remplir un système microfluidique de fluide génère facilement des bulles d'air qui le rendent inutilisable. Le remplissage d'un système sans bulles demande parfois des techniques compliquées (ex. l'utilisation de pompes à air) et fait l'objet de plusieurs études [30]–[33]. Une option qui permet de pallier ce problème en exploitant l'hydrophobicité du matériau [34] est d'opter pour un système ouvert. Ces systèmes peuvent être partiellement ouverts, permettant la formation de gouttelettes dans des ouvertures prévues à cet effet [21], [26], ou complètement ouverts, avec aucun canal fermé [27]. Concevoir ce type de dispositif demande une étude des phénomènes capillaires dans les canaux permettant le remplissage des dispositifs et la formation de gouttelettes.

Une technique éprouvée pour l'analyse du débit dans des canaux microfluidiques est l'utilisation de l'analogie des circuits électriques [35], [36]. L'analogie des circuits électriques de Safavieh et Juncker appelée *Capillarics*¹ permet de modéliser des systèmes microfluidiques complexes par une suite de composants simplifiés. Cependant, modéliser les effets de tension de surface proche de coins est plus difficile [37]–[39].

2.1 Analogie hydraulique-électrique

À ses débuts, l'analogie électrique-hydraulique a été utilisée pour faciliter l'explication du mouvement des électrons dans des circuits électriques venant d'une analogie entre l'équation de

¹ de *Capillarity et Electronics*

Poisson en électromagnétisme et l'équation de Stokes en hydrodynamisme. Dans ce travail, l'opposé est fait : l'analogie électrique-hydraulique permet de simuler la dynamique de remplissage d'un circuit microfluidique possédant des éléments standardisés complexes, tels les canaux (résistances), des volumes morts (capacitances), des valves capillaires (diodes), etc. L'équation de Hagen-Poiseuille et l'équivalent hydraulique des équations de maille de Kirchoff permettent de décrire la dynamique des fluides dans des canaux microfluidiques. L'équivalence électrique-hydraulique des composants utiles à cette étude est présentée au Tableau 2-1.

Tableau 2-1 : Composants microfluidiques et leur équivalent électrique

Élément hydraulique		Équivalent électrique	
Débit	Q	Courant	I
Pression	P	Tension	V
Microcanal	R	Résistance	R
Évent	P_{atm}	Masse	V_0
Front capillaire	P_{cap}	Diode	V_{seuil}
Pompe à débit	Q_{in}	Source de courant	I_{in}
Pompe à pression	P_{in}	Source de tension	V_{in}

Les composants du tableau 2-1 permettent de représenter les systèmes utilisés dans cette étude. La résistance hydraulique R_{hyd} d'un canal est fonction des propriétés physiques du fluide et de la géométrie du canal. Dépendamment de la coupe du canal, des expressions de complexité variable décrivent R_{hyd} qui peut être approximée par le cas d'un canal de coupe circulaire [40].

$$R_{hyd} \cong \frac{8\eta L}{r_{hyd}^2 A} \approx \frac{8\eta L}{\pi r_{hyd}^4}, \quad (2-1)$$

Avec la viscosité dynamique de l'eau η , la longueur du canal L , la coupe transversale du canal A et le rayon hydraulique r_h qui dépend en plus du périmètre de la coupe du canal P . Par ailleurs, $A \approx \pi r_{hyd}^2$ dans l'approximation d'un canal circulaire. Dans le cas d'un canal rectangulaire de coupe $h \times w$, le rayon hydraulique $r_{hyd} = (w^{-1} + h^{-1})^{-1}$.

$$r_{hyd} = \frac{2A}{P} \xrightarrow{\text{canal rectangulaire}} r_{hyd} = (w^{-1} + h^{-1})^{-1}, \quad (2-2)$$

À partir de ces concepts, le remplissage d'un PMÉ typique est brièvement expliqué. Le circuit de l'unité de base d'un PMÉ à gouttelettes est ensuite défini. Ce circuit peut être ajusté à différents modes de remplissage et d'opération du dispositif.

2.1.1 Remplissage d'un PMÉ

Un PMÉ de base tel que schématisé à la Figure 1-3 et rempli par une entrée. Dans des dispositifs hydrophobes, la présence de coins, pièges et extrusions au canal principal complique le remplissage, car ces caractéristiques du design microfluidique ont la tendance à générer des bulles d'air rendant le dispositif inutilisable. Si ce n'est pas possible de choisir un matériau hydrophile, certains chercheurs contournent partiellement le problème en rendant les parois hydrophiles soit : en les traitant avec des procédés physiques (ex. plasma d'oxygène pour le PDMS) [27] ou en les exposant à des surfactants (ex. remplir initialement le dispositif d'un liquide dont la tension de surface est plus faible, i.e. éthanol) [22]. Le modèle équivalent d'un PMÉ qui se remplit est simple, avec une pression d'entrée ΔP_e (ou un débit d'entrée Q_e) et la résistance hydraulique d'un microcanal R_c , N pièges en série sont schématisés comme suit.

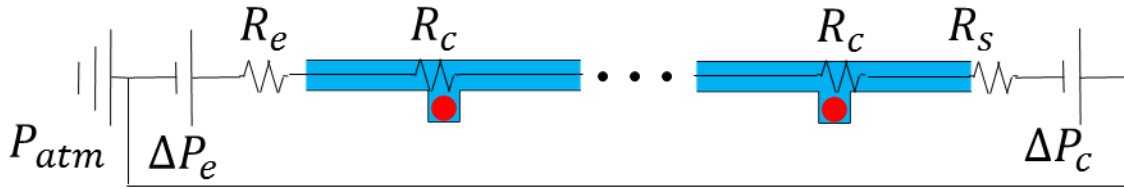


Figure 2-1 : Remplissage d'un PMÉ de base dont les canaux ont une résistance hydraulique R_c avec une résistance d'entrée R_e et une résistance de sortie R_s (résistances dues à des tubes d'entrée et de sortie du dispositif microfluidique). La pression d'entrée ΔP_e permet de remplir le dispositif et la pression capillaire ΔP_c du front capillaire dépend de l'hydrophobicité du matériau.

Dans ce cas, le remplissage est donné directement par le volume à remplir V_{tot} divisé par le débit d'entrée Q_e ou par une expression modifiée de la loi de Washburn (équation (2-4)) dans le cas d'une pression d'entrée ΔP_e [41]. La loi de Washburn (équation (2-3)), caractéristique d'un remplissage capillaire, est donnée avec L la longueur totale de tous les canaux, η et γ la viscosité et tension de surface de l'eau et θ_{cap} l'angle de contact du front capillaire.

$$t = \frac{2\eta L^2}{\gamma r \cos(\theta_{cap})} \quad (2-3)$$

$$t = \frac{R_{hyd} V}{2\Delta P_e} \quad (2-4)$$

2.1.2 Unité de base d'un PMÉ à gouttelettes

La différence fondamentale entre un PMÉ et un PMÉ à gouttelettes se situe au niveau du piège qui, dans le cas d'un PMÉ à gouttelettes, est un orifice ouvert à l'air libre. Ceci permet un remplissage du dispositif plus facile, car l'hydrophobicité des parois est un atout dans la formation de gouttelettes. De plus, ces orifices permettent d'évacuer les bulles d'air formées lors du remplissage. Le PMÉ à gouttelettes étudié dans ce mémoire est le « SIMSS Chip » de Mohana Marimuthu et al [26] qui, en plus des orifices de gouttelettes, comprend aussi un canal secondaire concentrateur de cellules.

Afin de représenter le système hydraulique par un schéma électrique, il faut considérer que l'ouverture de la gouttelette se remplit instantanément et qu'elle ne doit pas fuir; c'est-à-dire qu'elle n'a pas à être simulée. Simplifier le système réduit le problème à deux types de canaux : le canal principal et le canal secondaire. Le canal principal est celui présenté à la Figure 2-2 avec un débit Q_N qui traverse et ravitaille tous les puits. Chaque canal secondaire, ou puits supérieur dans le schéma de la Figure 2-2, est associé à une gouttelette et un débit q_N . La pression à l'intersection des canaux principal et secondaire et de la gouttelette est la valeur d'intérêt P_N .

À partir de la Figure 1-3, l'unité de base d'un PMÉ à gouttelettes est simplifiée et définie en termes de circuits. Puisque les fronts capillaires peuvent se mobiliser directement ou inversement, ils sont schématisés par des diodes Zener (ayant la même caractéristique). Les pressions pertinentes et les modes de remplissage sont définis à la Figure 2-2; il y en a trois qui décrivent le système le plus simplement possible.

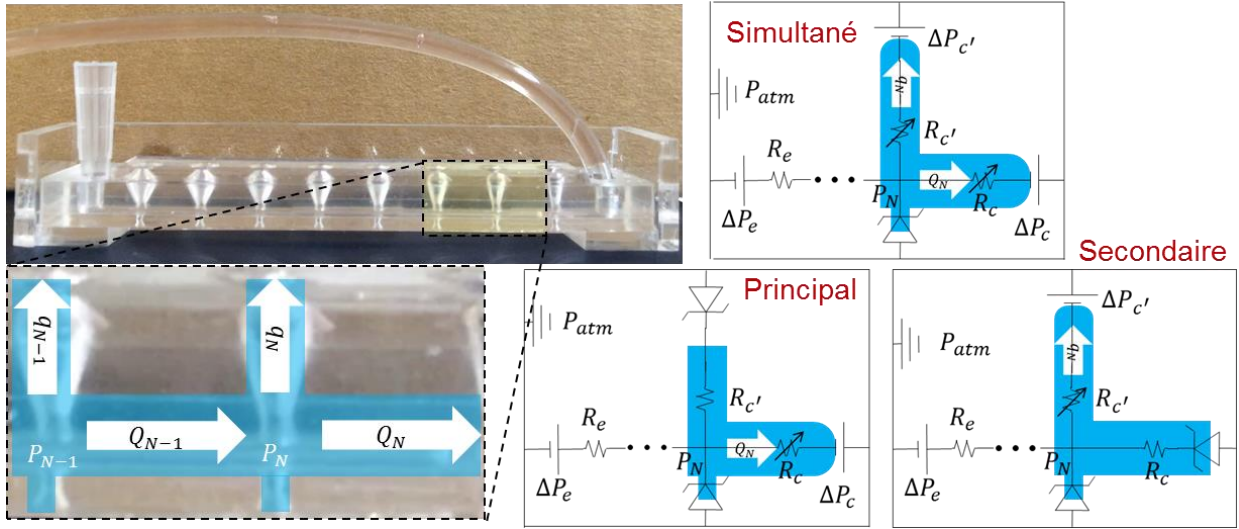


Figure 2-2 : Image d'un PMÉ à gouttelettes avec l'unité de base hydraulique représentée. Trois modes d'opération sont présentés : remplissage du canal (1) principal, (2) secondaire et (3) les deux simultanément. Les fronts capillaires immobiles sont schématisés par des diodes Zener. Les fronts capillaires mobiles sont schématisés par des sources de pression. Les résistances de canaux en remplissage sont variables.

La loi de Hagen-Poiseuille et la conservation de masse aux nœuds du réseau fluide permettent de déduire le débit Q_N dans tous les segments de canal avec un système d'équations algébriques [40]. La loi de Hagen-Poiseuille dicte que la chute de pression est liée au débit par la résistance hydraulique et donne l'équation de base dans chacun des canaux principaux : $(P_N - P_{N+1}) = Q_N R_c$. La loi hydrodynamique des nœuds dicte que la somme des débits aux nœuds est nulle : $\Sigma Q = 0$. La loi de Hagen-Poiseuille est simplifiée par la loi des nœuds qui revient à $Q_{N-1} = Q_N + q_N$.

Le débit Q_N et la pression P_N à chacun des maillons du dispositif peuvent alors être retrouvés avec le système d'équations qui découle des lois de maille. Dans un cas simplifié où tous les canaux sont remplis, le système est réduit à un nombre de canaux principaux en série. Ce cas est utilisé à la section suivante pour trouver les débits et pressions maximaux d'entrée pour empêcher le système de fuir.

2.2 Modèle capillaire de formation de gouttelettes

Certains dispositifs, présentés à la Figure 1-2, exploitent la courbure naturelle des gouttelettes d'eau due à la tension de surface comme piège pour faire croître des sphéroïdes ou piéger des microtissus. La tension de surface génère une pression capillaire qui garde la cohésion d'une interface. L'équation de Young-Laplace établit l'expression de cette pression capillaire [40] :

$$\Delta P_{cap} = \gamma \left(\frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2} \right), \quad (2-5)$$

où r_1 et r_2 sont les rayons capillaires r_{cap} de courbure de l'interface. La pression capillaire établit la différence de pression entre la phase non-mouillée (ex. l'air) et la phase mouillée (ex. l'eau). Une pression positive entraîne un mouvement spontané vers la phase non-mouillée et vice-versa.

L'hydrophobicité d'une paroi est définie par l'angle de contact θ_{cap} trouvé avec l'équation de Young qui relie les tensions de surface eau-air γ , eau-paroi γ_{e-p} et air-paroi γ_{a-p} à θ_{cap} [40]. Dépendamment du rayon hydraulique d'un canal r_{hyd} et θ_{cap} , le rayon capillaire r_{cap} est défini par la Figure 2-3 et la relation suivante :

$$r_{cap} = \frac{r_{hyd}}{\cos(\theta_{cap})}, \quad (2-6)$$

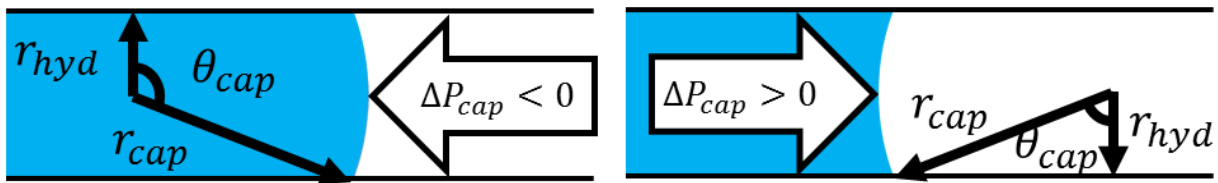


Figure 2-3 : Définition des grandeurs de l'équation (2-6) sur une coupe transversale pour retrouver r_{cap} . Un deuxième r_{cap} est défini sur un plan orthogonal à cette coupe. À gauche, le cas d'un front capillaire hydrophobe où $r_{cap} < 0$; à droite un front capillaire hydrophile. La flèche dicte la direction de la force ressentie par le fluide.

La pression capillaire ΔP_{cap} est donc reliée à ces grandeurs physiques par r_{cap} défini sur deux directions orthogonales. Si r_{cap} est identique sur les deux axes, la pression capillaire s'écrit :

$$\Delta P_{cap} = 2 \frac{\gamma}{r_{hyd}} \cos(\theta_{cap}) \quad (2-7)$$

Lorsqu'un front capillaire atteint un orifice, une gouttelette peut se former (Figure 2-4) de deux façons : (1) exploiter la tension de surface et la géométrie du dispositif pour former une gouttelette de taille prédéfinie [27] (2) appliquer une pression hydrostatique dans le dispositif pour contrôler la taille de la gouttelette [26]. Cette seconde façon plus générale est l'objet de l'étude dans ce mémoire. Dans tous les cas, la gouttelette ne doit pas dépasser une certaine dimension au-delà de laquelle la gravité la ferait tomber. La pression hydrostatique associée à cette dimension permet d'optimiser l'opération (débit maximal dans un canal adjacent à la gouttelette) et la conception (dimension d'orifices pour la formation de gouttelettes) de ce type de dispositif.

2.2.1 Dimensions critiques

La différence entre une gouttelette et une goutte est l'importance de l'effet de la gravité sur celle-ci [42] : ex. les gouttelettes constituent les nuages et les gouttes constituent la pluie. Le nombre de Bond (ou nombre d'Eötvös) est un nombre adimensionnel qui établit la prépondérance des forces gravitationnelles (volumiques) sur les forces capillaires (surfiques) [43] :

$$Bo = \frac{\rho g l_0^2}{\gamma}, \quad (2-8)$$

où l_0 est la longueur caractéristique du système (rayon de courbure de la gouttelette), ρ est la masse volumique du liquide dont est formée la goutte (eau), g est l'accélération gravitationnelle et γ est la tension de surface entre le liquide et le milieu externe (air).

La longueur capillaire l_{cap} [44], dérivée d'un nombre de Bond unitaire, est la longueur à partir de laquelle les forces gravitationnelles supplantent les forces capillaires stabilisant une gouttelette. Au-delà de cette longueur, une gouttelette devient une goutte sous l'effet de son propre poids. La dynamique de formation d'une goutte a été résolue analytiquement [45], mais sort de la portée de ce mémoire. Définir la longueur capillaire permet aussi de réécrire le nombre de Bond.

$$l_{cap} = \sqrt{\frac{\gamma}{\rho g}} \rightarrow Bo = \left(\frac{l_0}{l_{cap}} \right)^2 \quad (2-9)$$

La longueur capillaire (2-9) donne directement la dimension maximale d'un orifice au-dessus de laquelle une gouttelette ne peut plus se former à cause de la gravité. Cette dimension, caractéristique de chaque fluide, est égale à environ 2,7 mm dans le cas de l'eau. C'est-à-dire qu'il est impossible de former une goutte dans un orifice excédant 5,4 mm de diamètre.

En appliquant une pression directement à l'intérieur d'une gouttelette (comme quand un débit ou une pression hydrostatique sont imposés), il est possible de former une goutte même si $l_0 < l_{cap}$. Dans ce cas, il faut compromettre entre la dimension voulue de la gouttelette et l'intensité de la pression ou du débit à imposer dans le canal.

2.2.2 Pression hydrostatique critique

Dans le cas de la formation de gouttelette à un orifice, l'effet du coin de l'orifice change la dynamique de mouillage qui est schématisée à la Figure 2-4. La gouttelette génère une pression capillaire maximale lorsque son rayon r est minimum à la taille de l'orifice. Dans un dispositif hydrophobe en deçà de la limite définie par l_{cap} à l'équation (2-9), il faut appliquer une pression hydrostatique aux entrées du dispositif pour faire émerger la gouttelette, car elle ne sort pas d'elle-même. Un tel type de dispositif [26] est schématisé à la Figure 2-4 en remplaçant le puits de la Figure 1-3 par une gouttelette et en définissant la hauteur aux entrées h_e .

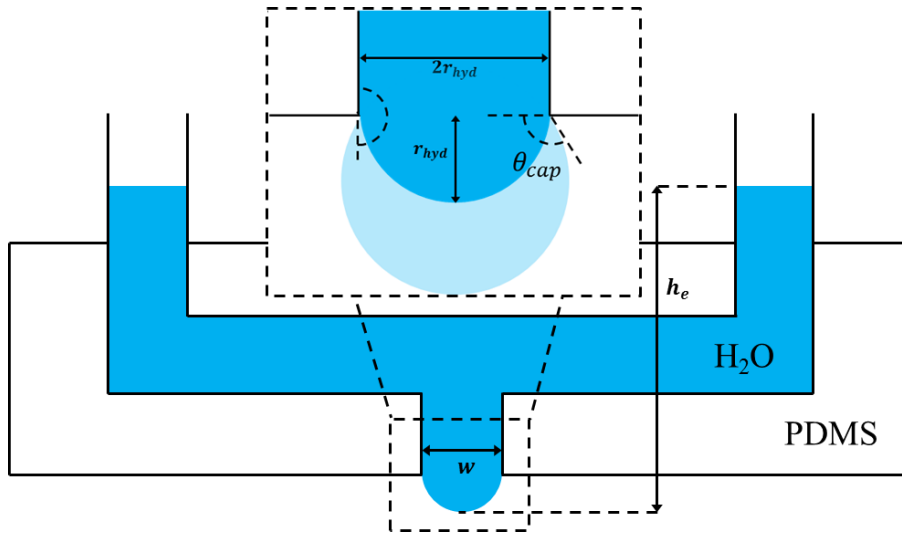


Figure 2-4 : Schéma d'un puits à gouttelette avec une pression hydrostatique aux entrées telle que $P_{in} = \rho g h_e$. Schéma de formation de gouttelette : la plus cohésive est en bleu opaque et la limite de mouillage d'une gouttelette est en bleu transparent.

Puisque la gouttelette a une cohésion maximale lorsque son rayon égale la dimension de l'orifice, la pression capillaire de fuite de la goutte ΔP_{g-f} est indépendante de l'hydrophobicité du dispositif dans le cas d'un dispositif hydrophobe. L'équation (2-5) devient donc :

$$\Delta P_{g-f} = \frac{2\gamma}{r_{hyd}}, \quad (2-10)$$

Dans un cas hydrostatique, cette pression capillaire de fuite permet de trouver la hauteur maximale de colonnes d'eau en fonction des paramètres du dispositif :

$$h_e < \frac{2\gamma}{r_{hyd}\rho g} \quad (2-11)$$

La formation de gouttelette est schématisée à la Figure 2-5 en fonction de la pression dans le canal à son niveau P_1 et du rayon de courbure de la gouttelette r_g . Sauf à $r_g = r_{hyd}$, il existe deux configurations de gouttelettes avec la même pression P_g . Une configuration stable réversible et une configuration instable irréversible. Si P_1 est gardé constant en deçà de ΔP_{g-f} , la gouttelette est stable et peut se retirer dans l'orifice (réversible). Si P_1 est gardé constant au-delà de cette pression, la gouttelette est instable et le dispositif fuit. Il est possible de garder une gouttelette instable si P_1 redescend en deçà de P_g immédiatement après sa formation. Cependant, elle ne peut plus se retirer dans l'orifice (irréversible) et garde sa forme. Si le rayon d'une gouttelette instable se rapproche de l_{cap} , la gravité prend le dessus et le dispositif fuit.

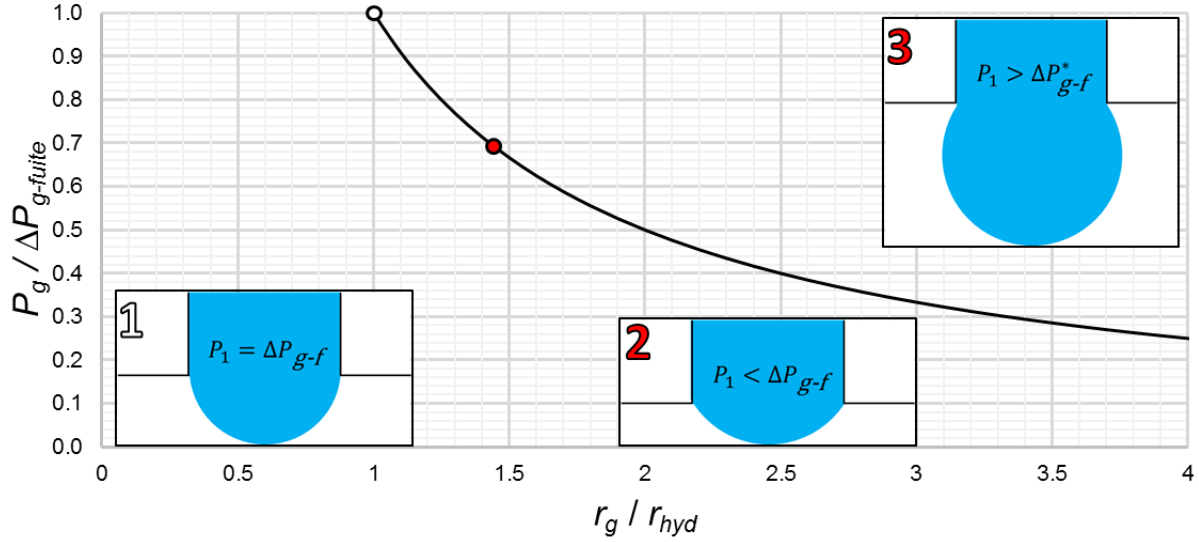


Figure 2-5 : Pression capillaire de la goutte P_g normalisée par la pression capillaire critique de fuite $\Delta P_{g-fuite}$ en fonction du rayon de la goutte r_g normalisée par le rayon hydraulique de l'orifice r_{hyd} . Les schémas d'une goutte stable ($P_1 < \Delta P_{g-f}$), limite ($P_1 = \Delta P_{g-f}$) et instable ($P_1 > \Delta P_{g-f}$) sont présentés. Les configurations (2) et (3) ont une pression et un rayon de courbure identiques.

Afin d'opérer un dispositif microfluidique à gouttelettes de façon reproductible, il faut l'opérer dans un régime stable de gouttelettes. C'est-à-dire que la pression P_1 ne doit pas dépasser ΔP_{g-f} . Cette pression P_1 augmente aussi avec un débit ou pression d'entrée.

2.2.3 Débit critique

Autre qu'une pression hydrostatique, il est possible de générer une pression au niveau de la gouttelette P_1 en imposant un débit Q_e ou une pression ΔP_e à l'entrée du canal adjacent. Cet effet est particulièrement important à considérer lors du remplissage et de l'opération d'un dispositif.

La loi de Hagen-Poiseuille relie le débit et la pression par la résistance hydraulique R_{hyd} . Soit une série de puits à gouttelette, la pression la plus élevée sera au niveau de la première gouttelette à partir de l'entrée P_1 . Trouver la pression à l'entrée pour un certain ΔP_e ou Q_e permet de trouver les pressions ou débits limites pour éviter que le dispositif fuie.

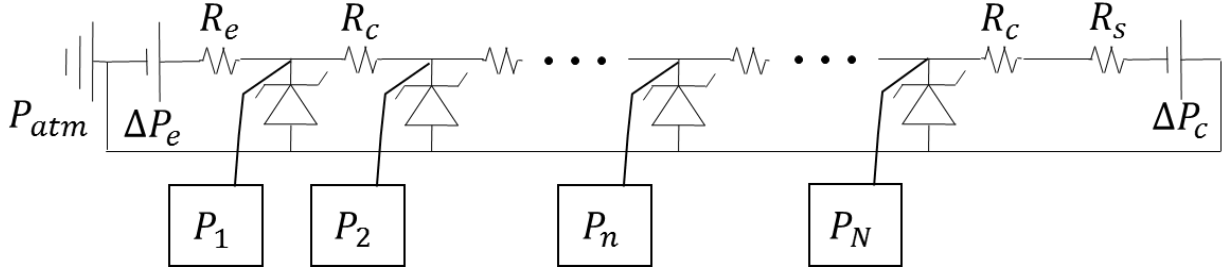


Figure 2-6 : Schéma électrique de N pièges à gouttelette en série. La pression à l'entrée ΔP_e peut être remplacée par un débit à l'entrée Q_e . La pression la plus élevée est P_1 au premier orifice. La pression du front capillaire est ΔP_c dans le canal reliant les pièges. Chaque piège est une diode Zener de pression d'opération inverse P_{cap} et de pression d'opération directe $P = 0$, car le dispositif est considéré comme hydrophobe. Le dispositif est exposé à l'air (pression atmosphérique P_{atm}).

Le schéma de la Figure 2-6 permet d'écrire les équations suivantes de pression P_1 .

$$P_1 = \Delta P_c + Q_{in}(R_s + NR_c)$$

$$P_1 = \frac{\Delta P_e(R_s + NR_c) + \Delta P_c R_e}{R_e + NR_c + R_s} \quad (2-12)$$

Puisque P_1 doit être inférieure à ΔP_{g-f} (équation (2-10)) pour éviter que le dispositif fuie, on trouve une inégalité pour ΔP_e et Q_e en fonction du nombre de dispositifs en séries.

$$Q_e < Q_{max} = \frac{\Delta P_{g-f} - \Delta P_c}{R_s + NR_c}$$

$$\Delta P_e < \Delta P_{max} = \Delta P_{g-f} + \frac{\Delta P_{g-f} - \Delta P_c}{R_s + NR_c} R_e = \Delta P_{g-f} + Q_{max} R_e \quad (2-13)$$

Avant d'établir les conditions de débits et pressions maximales, il faut noter que la condition sur la pression est superflue. Il est possible d'augmenter ΔP_{max} en ajoutant un tube d'entrée très résistif (R_e très grand). Cependant, cela ralentirait le taux de remplissage du dispositif.

La première condition qui découle des équations (2-13) est que $\Delta P_{g-f} - \Delta P_c$ doit être positif et préféablement assez élevé pour permettre un remplissage du dispositif relativement rapide avec

le débit ou la pression d'entrée. Pour un canal hydrophile ($\theta_{cap} < \pi/2$), cette condition limite le rayon hydraulique du canal r_{h-c} par rapport à celui de l'orifice de la gouttelette r_{h-g} .

$$r_{h-c} > \cos(\theta_{cap}) r_{h-g} \quad (2-14)$$

La deuxième condition détermine ce qui affecte le débit maximum : (1) le nombre de gouttelettes en série N ou (2) la résistance hydraulique des canaux R_c . En supposant que R_s et R_e sont beaucoup plus petits que R_c (dans le cas de tubes d'entrées larges et de canaux microfluidiques), Q_{max} peut être réécrit en fonction des paramètres géométriques du canal et de l'orifice.

$$Q_e < Q_{max} = \frac{\pi \gamma r_{h-c}^3}{4 \eta NL} \left(\frac{r_{h-c}}{r_{h-g}} - \cos(\theta_{cap}) \right) \quad (2-15)$$

L'équation (2-15) montre qu'il est possible d'augmenter le débit maximum possible en augmentant le rayon hydraulique du canal r_{h-c} , en diminuant la longueur ou le nombre de canaux NL , en diminuant le rayon hydraulique de la goutte par rapport à celui du canal r_{h-c}/r_{h-g} ou en augmentant l'hydrophobicité du canal θ_{cap} . Dans un contexte de remplissage de dispositif, le temps minimum requis pour remplir tous les orifices de gouttelettes t_{min} découle du volume à remplir ($V_{canaux} = NL\pi r_{h-c}^2$ dans l'approximation du rayon hydraulique) divisé par le débit maximum, soit :

$$t_{min} = \frac{V_{canaux}}{Q_{max}} = 4 \frac{\eta (NL)^2}{\gamma r_{h-c}} \left(\frac{r_{h-c}}{r_{h-g}} - \cos(\theta_{cap}) \right)^{-1} \quad (2-16)$$

Les façons de minimiser ce temps de remplissage sont identiques aux façons de maximiser le débit. Cependant, l'effet de la réduction de la longueur ou du nombre de canaux est augmenté NL ($NL \rightarrow (NL)^2$) et l'effet de l'augmentation du rayon hydraulique du canal r_{h-c} est diminué ($r_{h-c}^3 \rightarrow r_{h-c}$). Le résultat est une loi quadratique $t \sim L^2$ tel que prédit par la loi de Washburn pour un écoulement capillaire dans un canal droit à l'équation (2-4).

Contribution scientifique des modèles du Chapitre 2

Les conclusions des modèles de ce chapitre sont résumées au Chapitre 5, ont été présentées en partie à *MicroTAS 2015* [26] et seront incluses dans un article écrit par Mohana Marimuthu dont les figures clés sont présentées à l'annexe C.

Les résultats de dimensions et pression hydrostatique critiques (sections 2.2.1 et 2.2.2) ont été présentés à *MicroTAS 2015* et sont résumés à la section 5.1.1. À la section 5.2 de ce travail, les résultats de débit critique (section 2.2.3) sont comparés aux résultats hydrodynamiques du chapitre suivant (section 3.1) et de l'article (4.2.2.2).

Enfin, l'analogie hydraulique-électrique (section 2.1) peut être utilisée afin de modéliser précisément la dynamique de remplissage de PMÉ à gouttelettes en créant un programme avec l'application *MATLAB*. Ce dernier élément est une piste d'étude supplémentaire intéressante.

CHAPITRE 3 OPÉRATION DE SYSTÈMES MICROFLUIDIQUES

Ce chapitre résume les effets de l'opération de PMÉ. Cet aspect a été étudié principalement dans le cadre du dispositif développé par Mélina Astolfi, étudiante à la maîtrise du laboratoire de Thomas Gervais. Le résultat de ces analyses a été publié dans la revue *Lab on a Chip* [22], est soumis pour publication dans la revue *Scientific Reports* (article du Chapitre 4) et a été présenté par Mélina Astolfi [10], Thomas Gervais [28] et Mohammed Abdul Lateef [29] dans des conférences internationales. Pour comprendre l'opération des PMÉ, il faut étudier les phénomènes physiques qui entrent en jeu dans leur utilisation. Autre que le remplissage de ces dispositifs qui a été décrit au chapitre précédent, il faut analyser le comportement des fluides, des nutriments et des tissus.

Les principes de dynamique des fluides entrent en jeu lorsqu'un débit ou une pression sont imposés dans les canaux. Les effets hydrodynamiques incluent le piégeage, le cisaillement et l'éjection de tissus tels que schématisés à la Figure 3-2 et présentés à la section 3.1.

Les principes de transport de nutriments entrent en jeu lorsqu'un tissu est dans le dispositif. Les effets de diffusion et réaction incluent le transport et la consommation de gaz (oxygène) et de sucres (glucose) en solution dans le milieu par le tissu et sont présentés à la section 3.2.

Les effets hydrodynamiques ont lieu ponctuellement lors du piégeage et de l'éjection des tissus de leurs pièges (au début et à la fin d'une expérience) tandis que les effets de diffusion-réaction ont lieu tout au long de l'expérience. De ce fait, l'étude de la diffusion de nutriments est découplée de l'étude des effets hydrodynamiques. Cela réduit les degrés de liberté de l'analyse et produit une analyse pire cas du transport par diffusion.

Enfin, le principe de viabilité des tissus dans un contexte de modèles analytiques et de simulations numériques est défini à la section 3.3. Expliquer ce principe permet de mieux comprendre l'effet de la dynamique des fluides et du transport de nutriments sur les résultats biologiques de viabilité.

3.1 Dynamique des fluides

Écrire l'équation de conservation de moment cinétique en dynamique des fluides² pour des fluides newtoniens, continus et incompressibles permet de retrouver l'équation de Navier-Stokes [40]. Cette équation aux dérivées partielles non linéaires est présentée à l'équation (3-1) et décrit le comportement de fluides aux caractéristiques suivantes :

- Newtoniens, avec une relation linéaire entre le tenseur de contrainte de cisaillement et la composante visqueuse du tenseur vitesse de déformation;
- Continus, avec des propriétés caractéristiques (comme la densité ρ et la viscosité dynamique η) définies continuellement à travers le fluide;
- Incompressibles, avec une densité ρ uniforme et constante à travers le fluide.

L'équation de Navier-Stokes établit une relation entre le champ vectoriel de vitesse du fluide \mathbf{u} , sa pression p et la somme des forces volumiques exercées sur le fluide $\sum \mathbf{f}_v$ en N/m^3 .

$$\underbrace{\rho \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} + \rho(\mathbf{u} \cdot \nabla) \mathbf{u}}_{\text{Force inertielle}} = \underbrace{-\nabla p + \eta \nabla^2 \mathbf{u}}_{\text{Force visqueuse}} + \underbrace{\sum \mathbf{f}_v}_{\text{Force volumique}} \quad (3-1)$$

Le nombre de Reynolds Re , un nombre adimensionnel critique dans l'étude de ces fluides, est tiré de la normalisation de l'équation de Navier-Stokes avec une vitesse et une longueur caractéristiques u_0 et L_0 . Ce nombre est présenté à l'équation (3-2) et décrit la prépondérance des forces inertielles sur les forces visqueuses; où un nombre de Reynolds élevé est caractéristique d'un écoulement turbulent et un nombre faible est caractéristique d'un écoulement laminaire.

$$Re = \frac{\rho}{\eta} u_0 L_0 \rightarrow \begin{array}{ll} < 1 & \text{Laminaire} \\ 1 - 4000 & \text{Transitoire} \\ > 4000 & \text{Turbulent} \end{array} \quad (3-2)$$

² Aussi connu sous le nom d'équation du moment cinétique de Cauchy

Le régime d'écoulement change dramatiquement le comportement du fluide [46] comme le montre la Figure 3-1 qui compare un écoulement laminaire à un écoulement turbulent. Il est donc important de circonscrire le régime d'intérêt avant d'étudier la dynamique des fluides.

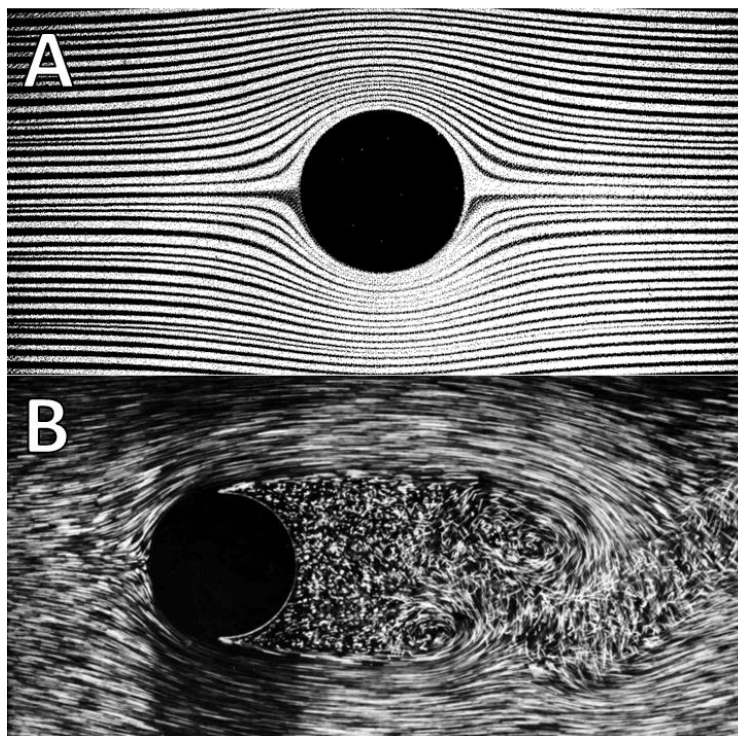


Figure 3-1 : Colorant permettant de voir les lignes de flux autour d'un cylindre dans l'eau entre deux plaques séparées de 1 mm pour un régime visqueux ($Re \ll 1$) (A) et un régime inertiel ($Re \gg 1$) (B) [46].

L'équation de Navier-Stokes dans sa forme générale n'a pas de solution analytique et requiert soit (1) une simplification permettant de trouver une solution analytique dans certains cas d'écoulements laminares ou (2) une résolution numérique avec des méthodes de mécanique des fluides numérique (MFN)³ et, dans le cas de cette recherche, la méthode des éléments finis (MÉF). Cette seconde méthode est utilisée dans l'article publié dans le cadre de ce mémoire.

En supposant que les parois d'un dispositif sont rigides, c'est-à-dire que la géométrie reste constante indépendamment de la force exercée sur les parois par le fluide, il est possible de dériver

³ Aussi connu sous le nom de *computational fluid dynamics* ou CFD en anglais

des solutions analytiques simples pour décrire le comportement de modèles tissulaires 3D dans un dispositif microfluidique. Dans cette section, une suite d'analyses pire cas permet de définir des débits critiques pour atteindre certains régimes opérationnels de PMÉ. Premièrement, les différents aspects qui affectent la dynamique de piégeage de tissus sont présentés. Deuxièmement, les débits nécessaires afin d'atteindre des contraintes de cisaillement potentiellement dommageables pour les tissus sont trouvés. Les conditions d'endommagement de tissus sont décrites plus en détail à la section 3.3.1. Troisièmement, les débits critiques afin d'éjecter les tissus sont trouvés. Le résultat de ces analyses est inclus dans l'article soumis à *Scientific Report* dans le cadre de ce mémoire.

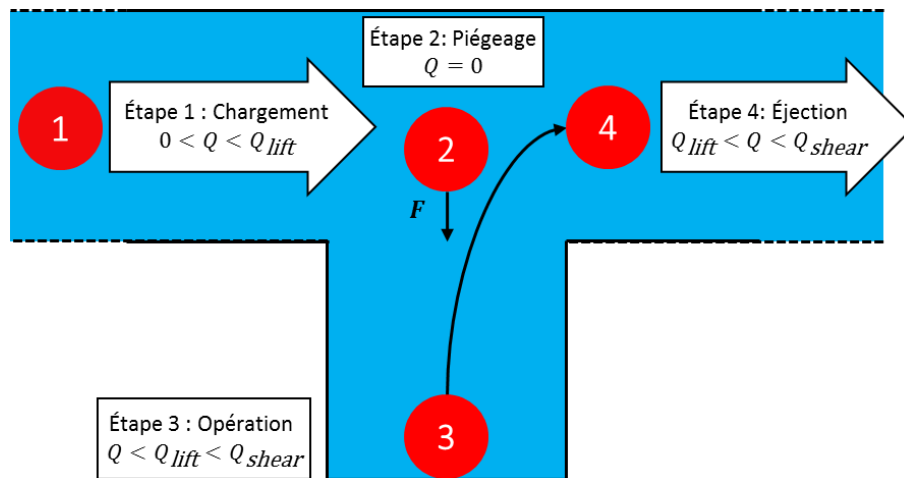


Figure 3-2 : Schéma des effets hydrodynamiques de l'opération d'un PMÉ avec un débit Q . (1) Le chargement des tissus se fait en deçà du débit d'éjection des tissus Q_{lift} (défini à la section 3.1.3) afin d'assurer la stabilité du piégeage. (2) Le piégeage exploite une des forces volumiques listées dans l'introduction pour tirer le tissu dans le piège, si la force de piégeage est faible (ex. gravité), Q doit être nul pour permettre le piégeage. (3) L'opération du dispositif (chargement des tissus et renouvellement du milieu de culture) se fait en deçà de Q_{lift} et du débit critique de cisaillement Q_{shear} (défini à la section 3.1.2) afin d'assurer la viabilité des tissus (définie à la section 3.3). (4) L'éjection des tissus se fait avec un débit en deçà de Q_{shear} et au-delà de Q_{lift} .

3.1.1 Dynamique de piégeage

Les mécanismes de piégeage étudiés dans ce mémoire utilisent des forces volumiques. Ces forces agissent sur l'entièreté du tissu simultanément et, dépendamment de leur ordre de grandeur, permettent un piégeage plus ou moins rapide. La force volumique la moins grande de celles présentées en introduction est la gravité et permet une étude pire cas du piégeage. Le premier effet

de dynamique des fluides à analyser est donc le temps de sédimentation d'un tissu dans un PMÉ. Ce temps doit être suffisamment faible pour permettre un piégeage systématique et reproductible des tissus.

Indépendamment de la géométrie du système, la vitesse \mathbf{v}_T d'un tissu qui sédimente est tirée de la seconde loi de Newton $\sum \mathbf{F} = m\mathbf{a}$. La vitesse terminale de sédimentation \mathbf{v}_{sed} est trouvée avec $\sum \mathbf{F} = \mathbf{0}$. Les forces agissant sur un tissu T qui sédimente dans un fluide F sont la traînée, le poids et la poussée d'Archimède. Ces deux dernières forces combinées définissent la flottabilité du tissu et sont fonction de la gravité $\mathbf{g} \approx 9.8 \text{ m/s}^2$. La traînée s'oppose au mouvement du tissu et dépend de la géométrie du corps qui sédimente et du régime d'écoulement (nombre de Reynolds) du milieu. Dans un régime d'écoulement laminaire, la traînée sur un tissu sphérique de diamètre d et de volume V suit la loi de Stokes $\mathbf{F}_{traînée} = 3\pi\eta d\mathbf{v}_{T/F}$ [40]. La vitesse $\mathbf{v}_{T/F}$ est la vitesse du tissu par rapport au fluide, d'où l'équation suivante qui permet de retrouver la vitesse de sédimentation terminale \mathbf{v}_{sed} colinéaire à la gravité dans un milieu infini v_{inf} (où $v_F \approx 0$),

$$\sum \mathbf{F} = \mathbf{0} = -3\pi\eta d\mathbf{v}_{sed} + (\rho_T - \rho_F)V\mathbf{g} \rightarrow v_{inf} = \frac{g}{18\eta}(\rho_T - \rho_F)d^2, \quad (3-3)$$

où un tissu plus dense que le fluide ($\rho_T > \rho_F$) donne une vitesse dans le même sens que la gravité. Dans un milieu fini, les parois et le fond ont un effet de ralentissement sur la vitesse v_{inf} de sédimentation. Ces effets sont schématisés à la Figure 3-3 et expliqués aux sections suivantes.

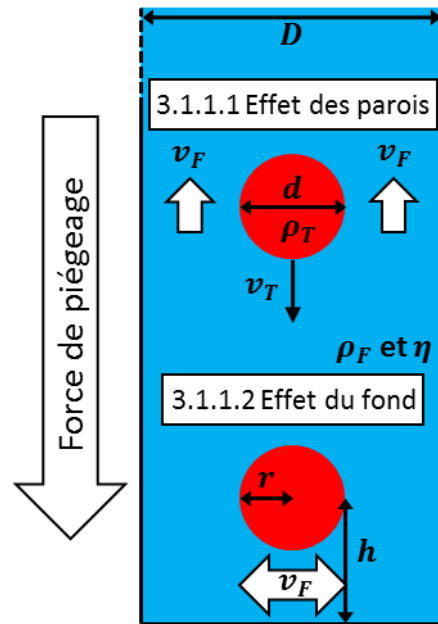


Figure 3-3 : Schéma des effets à étudier pour la dynamique de piégeage d'un tissu sphérique de diamètre $d = 2r$ et de densité ρ_T . Pour l'effet des parois, le tissu est considéré loin du fond dans un piège cylindrique de diamètre D . Pour l'effet du fond, le tissu est placé à une hauteur h du fond. Le piège est rempli d'un fluide de densité ρ_F et de viscosité η . Ces effets entrent en compte aux étapes 1 et 2 schématisées à la Figure 3-2.

3.1.1.1 Effet des parois

La dynamique de sédimentation dans un milieu infini est donnée directement par l'équation (3-3). Cependant, dans un milieu confiné comme un piège microfluidique, la vitesse du milieu n'est pas nulle $v_F \neq 0$. Ceci augmente la traînée de Stokes et diminue la vitesse de sédimentation d'un facteur k . La vitesse de sédimentation corrigée prend donc la forme suivante : $v_{sed} = kv_{inf}$.

Plusieurs chercheurs ont tenté de trouver une solution à ce problème dans le cas d'une géométrie simplifiée, soit une sphère de diamètre d qui sédimente dans un cylindre de diamètre D infiniment long [47]. En changeant le référentiel du problème à celui d'une sphère immobile avec un cylindre qui bouge à v_{sed} autour, on peut trouver la solution numérique du problème [48]. Une solution analytique lourde à évaluer numériquement a été trouvée par *Haberman et Sayre* qui présentent une approximation analytique valide pour des ratios d/D inférieurs à 0.8 [49]. Une autre approximation analytique valide pour des ratios d/D inférieurs à 0.2 et supérieurs à 0.7 a été

trouvée par *Francis* [50]. La Figure 3-4 compare ces différents ratios aux solutions numériques du problème présentées en détail dans l'article.

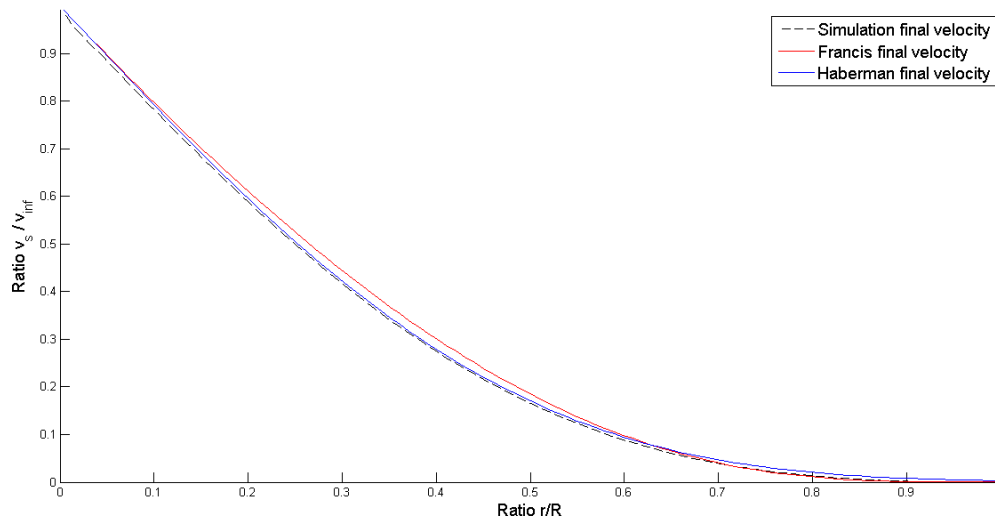


Figure 3-4 : Comparaison des facteurs de correction à la vitesse terminale de sédimentation dans un piège cylindrique en fonction du ratio d/D pour l'approximation d'Haberman, de Francis et pour les solutions de simulations numériques

Dans le contexte de l'article publié dans le cadre de ce mémoire, l'approximation de Haberman est choisie, car elle est plus exacte pour les diamètres considérés $d < 0.8D$. Dans un piège non cylindrique, le facteur de correction se trouvera en deçà de 1 et au-delà de celui présenté à la Figure 3-4. En considérant le cas limite où $d = D$: dans un cylindre, cela empêcherait le tissu de sédimenter, car le fluide ne pourrait pas le contourner ($k = 0$) tandis que dans tout autre prisme (à base triangulaire, carrée, etc.) le fluide pourrait ($k > 0$). Numériquement parlant, ceci est analogue à un coefficient de traînée plus grand dans le cas d'un tissu sphérique dans un cylindre que dans un prisme à base quelconque.

3.1.1.2 Effet du fond

Similairement au ralentissement hydrodynamique ressenti par un tissu dû aux parois d'un piège, certains chercheurs ont trouvé un ralentissement dû au fond. L'étude du mouvement d'un tissu sphérique de rayon r dans un espace confiné a été effectuée par *Happel et Brenner* [51]. Dans le cas d'un tissu bougeant vers une paroi, l'équation régissant le ralentissement k est la suivante[52] :

$$k^{-1} = \frac{4}{3} \sinh(x) \sum_{n=1}^{\infty} \frac{n(n+1)}{(2n-1)(2n+3)} \left[\frac{2 \sinh((2n+1)x) + (2n+1) \sinh(2x)}{4 \sinh^2\left(\left(n + \frac{1}{2}\right)x\right) - (2n+1)^2 \sinh^2(x)} - 1 \right], (3-4)$$

où $x = \text{acosh}(h/r)$ avec h la distance entre le centre du tissu sphérique et la paroi.

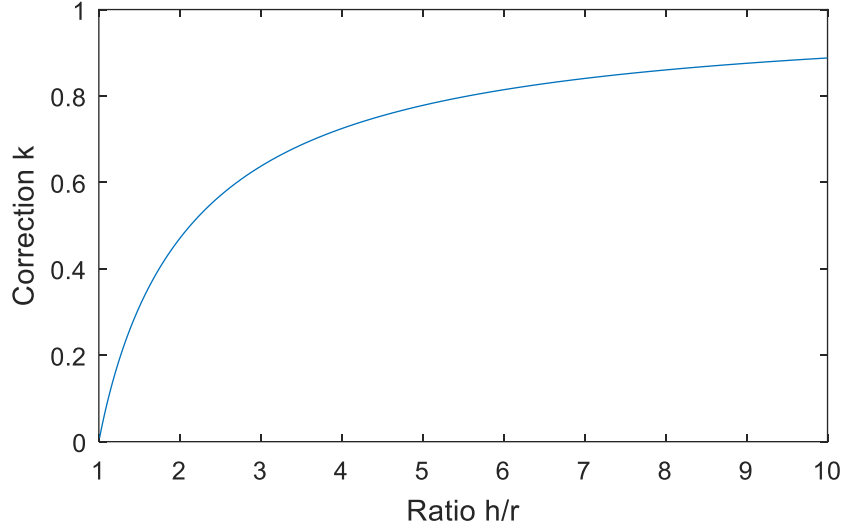


Figure 3-5 : Correction k de la vitesse de sédimentation en fonction du ratio h/r caractéristique de la distance entre la paroi et le centre du tissu sphérique; $h/r = 1$ implique que le tissu est collé à la paroi

Cet effet a été négligé dans l'article publié dans le cadre de ce mémoire, car il ne devient important que lorsque le tissu est déjà piégé. De plus, le ralentissement dû au fond est indépendant de la forme du piège et est donc appliqué sans discrimination à tous les temps de sédimentation. Ces résultats n'ont donc pas été rapportés dans l'article.

3.1.2 Contrainte de cisaillement

Dans le souci de créer des dispositifs qui émulent mieux les conditions *in vivo*, le conditionnement mécanique de tissus et l'effet du cisaillement sur leur développement font l'objet de beaucoup de recherche. Plusieurs dispositifs sont conçus pour étudier différentes façons d'appliquer le cisaillement [53]. Un tissu exposé à un débit est soumis à des contraintes de cisaillement τ qui, si elles excèdent les valeurs ressenties par le tissu *in vivo* τ_{max} , peuvent

l'endommager. Le concept d'endommagement de tissu est discuté plus en profondeur à la section 3.3.1. Il est donc important d'étudier quels paramètres de la conception d'un dispositif affectent les contraintes de cisaillement.

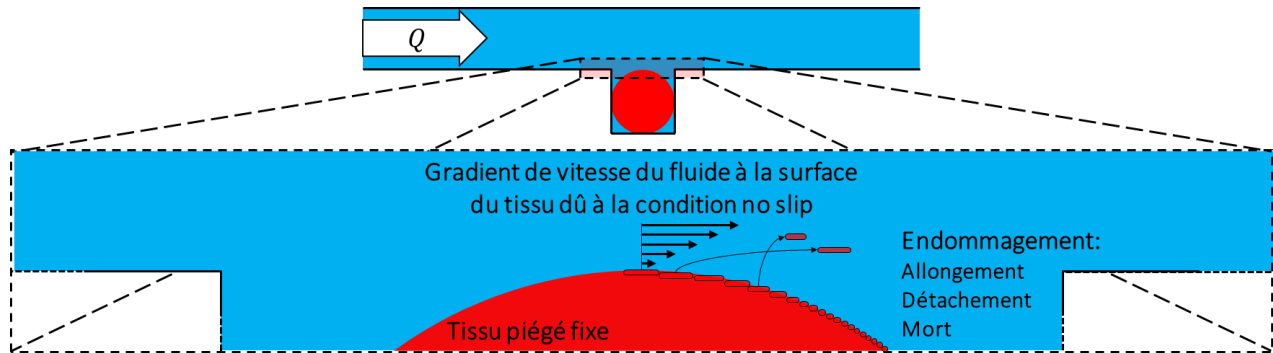


Figure 3-6 : Schéma de l'effet de la contrainte de cisaillement dans une configuration expérimentale pire cas : un tissu piégé fixe assez gros pour que son point le plus haut soit soumis à des vitesses du fluide similaires à celles dans le canal principal. Le gradient de vitesse du fluide génère une contrainte de cisaillement à la surface du tissu qui peut l'endommager (concept expliqué à la section 3.3.1). Cet effet entre en compte aux étapes 3 et 4 schématisées à la Figure 3-2.

Tenter d'évaluer la contrainte de cisaillement analytiquement sur un tissu au fond d'un piège est superflu pour une analyse pire cas de ce phénomène (schématisée à la Figure 3-6). Quelques suppositions sont nécessaires pour effectuer cette analyse :

- Les tissus libres dans le canal vont à la vitesse du fluide, ce qui implique que la contrainte ressentie par les tissus est nulle ou minimale dans le canal;
- La contrainte de cisaillement maximale dans un PMÉ est située au milieu de la paroi la plus large dans le canal, ce qui implique que la solution de Navier-Stokes laminaire dans un canal rectangulaire au point marqué d'une croix rouge à la Figure 3-7 est suffisante pour trouver le cisaillement maximum;
- Les tissus piégés sont les seuls à être soumis à des contraintes de cisaillement, ce qui implique que la contrainte maximum dans le PMÉ sera plus élevée que la contrainte maximum ressentie par les tissus.

Plus généralement, les contraintes visqueuses τ_{xy} d'un fluide allant vers une direction x sur une surface y sont reliées à la vitesse de cisaillement $\dot{\gamma}$ par la viscosité dynamique η du fluide. La

vitesse de cisaillement elle-même est égale à la dérivée dans la direction y orthogonale à la surface y du profil de vitesse $u_x(y, z)$ généré par un débit imposé dans un fluide.

$$\tau_{xy} = \eta \frac{\partial u_x(y, z)}{\partial y} \quad (3-5)$$

La solution de l'équation de Navier-Stokes (3-1) dans le régime laminaire permet de retrouver le profil du vecteur de vitesse d'un écoulement dans un canal rectangulaire [43]. Cette solution, présentée à l'équation (3-6), est suffisante pour une analyse pire cas du cisaillement, car en régime laminaire, les forces visqueuses sont beaucoup plus grandes que les forces inertielles, générant donc des gradients de vitesse plus élevés. La solution est présentée graphiquement à la Figure 3-7.

$$u_x(y, z) = \frac{4h^2 \Delta p}{\pi^3 \eta L} \sum_{n, \text{impair}} \frac{1}{n^3} \left[1 - \frac{\cosh\left(n\pi \frac{y}{h}\right)}{\cosh\left(n\pi \frac{w}{2h}\right)} \right] \sin\left(n\pi \frac{z}{h}\right), \quad (3-6)$$

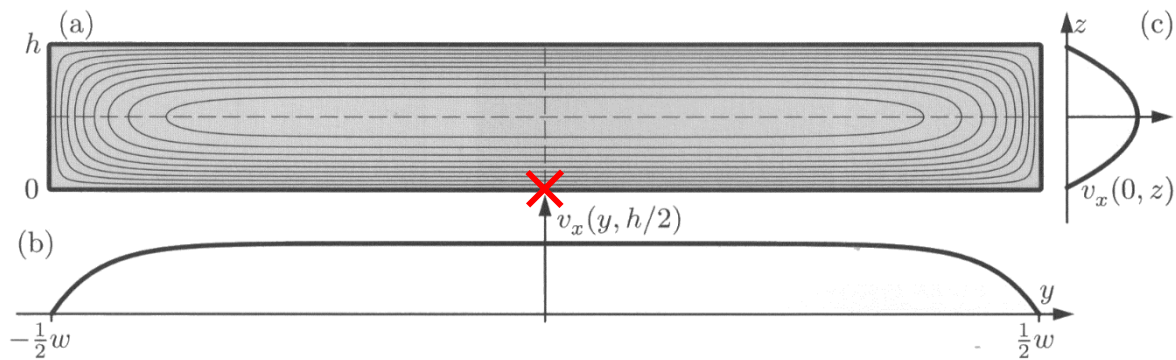


Figure 3-7 : Coupe transversale d'un canal rectangulaire. Tracé de contours de la solution de l'équation de Navier-Stokes dans le régime laminaire (a) avec le profil maximum sur l'axe y (b) et z (c). Le point de contrainte maximale est marqué d'une croix rouge. Les paramètres h et w utilisés à l'équation (3-6) sont définis à cette figure. Tirée de [43].

Le débit Q est relié à la pression ΔP par la résistance hydraulique R , relation nommée la loi de Hagen-Poiseuille, soit $\Delta P = QR$. Cette relation est dérivée en intégrant l'équation (3-6) sur la coupe de la Figure 3-7 pour trouver le débit Q [43]. En la réintroduisant à l'équation (3-6) pour avoir une relation dépendante du débit imposé, la relation devient la suivante :

$$u_x(y, z) = \frac{48Q}{\pi^3 h w} \frac{\sum_{n, \text{impair}}^{\infty} \frac{1}{n^3} \left[1 - \frac{\cosh\left(n\pi \frac{y}{h}\right)}{\cosh\left(n\pi \frac{w}{2h}\right)} \right] \sin\left(n\pi \frac{z}{h}\right)}{1 - \frac{192}{\pi^5} \frac{h}{w} \sum_{n, \text{impair}}^{\infty} \frac{1}{n^5} \tanh\left(n\pi \frac{w}{2h}\right)} = \frac{48}{\pi^3} \frac{Q}{h w} \frac{S(y, z)}{S1}, \quad (3-7)$$

où le quotient des deux sommes sur les n impairs est égal à $S(y, z)/S1$.

La première supposition dicte que la contrainte de cisaillement dans le canal est un maximum absolu ressenti par le tissu. La deuxième supposition et l'équation (3-5) dictent que la dérivée de l'équation (3-7) est évaluée à $(y, z) = (0, 0)$. La troisième supposition dicte que les paramètres h et w sont directement la hauteur et la largeur du canal considéré. Il faut donc dériver $u_x(y, z)$ par rapport à z pour trouver la contrainte τ_{\max} au point représenté par la croix rouge de la Figure 3-7.

$$\tau_{xz}(y, z) = \frac{48}{\pi^3} \frac{Q\eta}{h w S1} \frac{\partial S(y, z)}{\partial z} \quad (3-8)$$

$$\tau_{\max} = \tau_{xz}(0, 0) = \frac{48}{\pi^2} \frac{Q\eta}{h^2 w S1} \sum_{n, \text{impair}}^{\infty} \frac{1}{n^2} \left[1 - \frac{1}{\cosh\left(n\pi \frac{w}{2h}\right)} \right]$$

Dans le cas d'un canal carré ($h = w$), l'équation (3-7) prend la forme suivante :

$$\tau_{\max} = \frac{48}{\pi^2} \frac{Q\eta}{w^3} S0, \quad (3-9)$$

où $S0 \approx 1.9755$, $h = w$ est la taille du côté du canal, Q est le débit imposé à l'entrée, η est la viscosité dynamique et τ_{\max} est la contrainte maximale pouvant être ressentie par un tissu transporté dans un PMÉ. Le débit Q_{shear} à ne pas dépasser qui génère une contrainte critique τ_{\max} établie dans la littérature est donné par l'équation suivante.

$$Q < Q_{\text{shear}} = \frac{\pi^2}{48 S0} \frac{\tau_{\max}}{\eta} w^3 \quad (3-10)$$

Ce résultat est utilisé dans l'article soumis pour publication dans le cadre de ce mémoire pour étudier la contrainte de cisaillement dans des PMÉ.

3.1.3 Portance et éjection des tissus

Une particule sphérique dans un écoulement laminaire peut être sujette à des forces orthogonales à la direction de l'écoulement, dans la direction d'un gradient de vitesse et dans un sens qui dépend du régime de l'écoulement. Ce phénomène a des ramifications dans l'opération de PMÉ, car si un débit élevé génère des forces de portance excédant la force piégeant l'échantillon, il est éjecté du piège. L'étude des forces de portance dues à des gradients de vitesse fait l'étude de beaucoup de recherche en MFN [54]–[57].

La dynamique d'éjection des tissus de leurs pièges nécessite de trouver les débits nécessaires afin de générer une portance suffisante. Dans l'analyse suivante, la valeur minimale du débit nécessaire à l'éjection des tissus Q_{lift} est évaluée. Les deux façons de calculer l'ordre de grandeur de la portance sont le principe de Bernoulli [58] et la formule générale de portance [57], [59]. La première méthode, schématisée à la Figure 3-8, effectue de grossières approximations qui conduisent à une solution suffisante pour étudier l'éjection de tissus. La deuxième méthode, non schématisée à la Figure 3-8, est complète, mais conduit à une solution beaucoup trop complexe à appliquer dans un contexte de design de dispositifs.

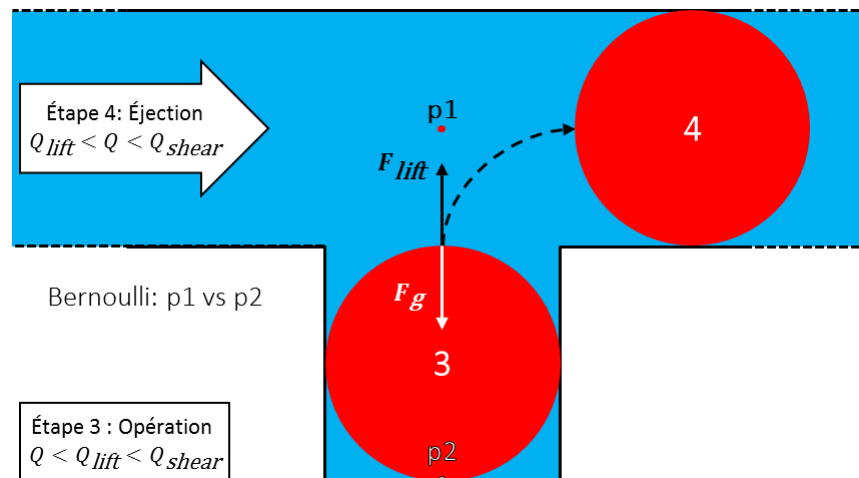


Figure 3-8 : Schéma de l'effet de portance étudié. Lors de l'opération du dispositif, assurer la stabilité du piégeage veut dire de garder le débit en deçà du débit d'éjection Q_{lift} . Cet effet entre en compte aux étapes 1, 3 et 4 schématisées à la Figure 3-2.

3.1.3.1 Principe de Bernoulli

Le principe de Bernoulli est tiré du principe de conservation d'énergie et dicte que, dans un écoulement en régime permanent, la somme de tous les composants énergétiques (cinétique, potentielle et interne) est constante sur la même ligne de flux. En négligeant les forces internes (qui sont la viscosité et la gravité dans le cas de PMÉ), si la vitesse d'un fluide diminue, son énergie potentielle augmente. L'équation de Bernoulli est donc :

$$\frac{u_1^2}{2} + \frac{p_1}{\rho} = \frac{u_2^2}{2} + \frac{p_2}{\rho}, \quad (3-11)$$

où la vitesse u et la pression p d'un fluide de densité ρ sont définies à deux endroits (indices 1 et 2). Utiliser l'équation de Bernoulli pour estimer la portance sur le tissu demande des suppositions menant à une valeur sous-estimée du débit critique d'éjection Q_{lift} (ou une surestimation de la force de portance réelle). Les suppositions et leur impact sur l'analyse sont énumérés ici-bas.

- Le régime d'écoulement inertiel où les forces visqueuses sont négligeables par rapport aux forces inertielles (justifie l'utilisation de l'équation de Bernoulli, mais conduit à une surestimation de la force de portance);
- La vitesse du fluide dans le canal u_c est donnée par la vitesse moyenne obtenue en divisant le débit Q par la coupe transversale du canal $A_c = hw$;
- La vitesse du fluide au bas du piège dans un PMÉ est supposée nulle $u_p = 0$;
- La différence de pression dérivée de l'équation de Bernoulli ($\Delta P = P_p - P_c$ où P_p est la pression au bas du tissu ou au fond du puits et P_c est la pression en haut du tissu, proche du canal) est appliquée sur la coupe transversale du tissu A_T (qui donne la force de portance avec $F_{\text{lift}} \approx A_T \Delta P$);
- La force de portance F_{lift} doit excéder le poids et la poussée d'Archimède F_g sur le volume de tissu V ;
- Le tissu à éjecter est sphérique de diamètre d et de densité constante ρ_T .

Avec ces suppositions et l'équation (3-11), la force exercée par la gravité F_g et la force de portance F_{lift} sont retrouvées avec $u_1 = u_C$, $p_1 = p_C$, $u_2 = u_P$ et $p_2 = p_P$.

$$F_{\text{lift}} \approx \frac{1}{2} \rho Q^2 \frac{A_T}{A_C^2} \quad (3-12)$$

$$F_g = (\rho_T - \rho) V g$$

Avec un canal de coupe transversale carrée ($w = h$) et en remplaçant le volume et la coupe du tissu par $V = \pi d^3/6$ et $A_t = \pi d^2/4$, le débit nécessaire pour éjecter un tissu Q_{lift} (quand $F_{\text{lift}} > F_g$) est trouvé :

$$Q > Q_{\text{lift}} = \sqrt{\frac{4}{3} d w^4 g \left(\frac{\rho_T}{\rho} - 1 \right)} \quad (3-13)$$

Cette équation ne considère ni la viscosité qui dissipe l'énergie ni le gradient de vitesse appliqué sur la hauteur du piège. Q_{lift} est donc sous-estimé (ou la force de portance est surestimée) et n'est valide que pour des nombres de Reynolds élevés. Cette supposition est vérifiée en trouvant la dimension caractéristique w_{min} au-dessus de laquelle le régime devient transitoire avec l'équation (3-2). Pour un canal carré, la dimension caractéristique est $L_0 = 37w/6$ [60]. Pour que les forces inertielles prennent le dessus sur les forces visqueuses, le nombre de Reynolds doit être $Re > 1$. Pour ce calcul, la vitesse caractéristique est la vitesse moyenne dans le canal $u_0 = Q_{\text{lift}}/w^2$ et le tissu a un diamètre égal au côté du canal ($w = d$). L'équation suivante donne la dimension caractéristique minimale montrée à la Figure 3-9.

$$Re(Q = Q_{\text{lift}}) = \frac{37 \rho}{6 \eta} \sqrt{\frac{4}{3} w^3 g \left(\frac{\rho_T}{\rho} - 1 \right)} > 1 \quad (3-14)$$

$$w > w_{\text{min}} = \left[\left(\frac{6 \eta}{37 \rho} \right)^2 \frac{3}{4 g \left(\frac{\rho_T}{\rho} - 1 \right)} \right]^{\frac{1}{3}}$$

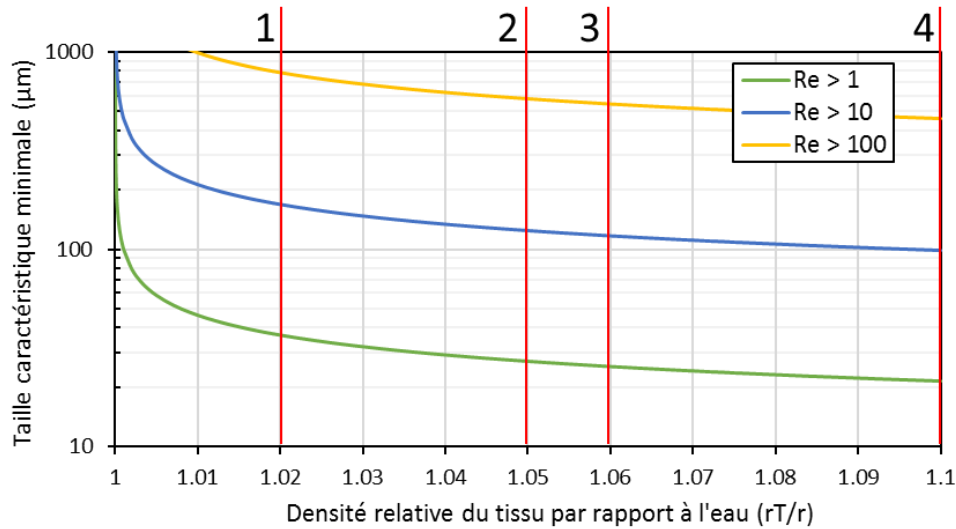


Figure 3-9 : Validité de l'équation de Bernoulli : taille minimale w_{\min} pour que l'équation de Bernoulli s'applique avec un nombre de Reynolds cible de 1, 10 et 100 dépendamment de la densité relative du tissu ρ_T/ρ . Un tissu épithélial typique a une densité relative autour de 1,02 (1) [22] à un maximum de 1,05 (2) [61], un tissu musculaire jusqu'à 1,06 (3) [62]. La levure, un organisme unicellulaire typique, a une densité relative allant jusqu'à 1.1 (4) [63].

La Figure 3-9 considère une densité ρ et une viscosité dynamique η de l'eau à 37°C, la température généralement utilisée dans un incubateur. La figure montre que les effets inertiels commencent à prendre le dessus ($Re > 1$) pour des dispositifs aussi petits que 30 μm , mais ne dominant ($Re > 100$) qu'à partir de 700 μm . Expérimentalement, la taille d'un modèle tissulaire 3D peut aller d'un petit amas de cellules ($\sim 40 \mu m$) à un tissu micro-disséqué ($\sim 600 \mu m$). Une densité relative autour de 1.02 est typique d'un tissu biologique [22]. Ces résultats montrent que l'approximation de la portance par le principe de Bernoulli suffit à une analyse pire cas de l'éjection de tissus.

3.1.3.2 Formule générale de la portance dans des microcanaux

La solution analytique de la portance sur un tissu sphérique dans un microcanal fait l'objet de beaucoup de recherche dans le domaine de la microfluidique. Les publications phares considèrent quatre phénomènes de portance principaux :

- La portance due au mouvement parallèle à une paroi F_p (tendance au tissu sphérique de s'y éloigner) [52], [54], [56], [64];

- La portance due à un gradient de vitesse autour du tissu F_{GV} (tendance au tissu sphérique de descendre le gradient ou de s'approcher d'une paroi) [17], [59], [64];
- Le portance de glissement-cisaillement F_{GC} dans le cas d'un tissu qui ne va pas à la vitesse du fluide ou un décalage entre le mouvement du fluide et celui du tissu (tendance au tissu sphérique d'aller vers le centre du canal) [65];
- Correction à la portance due à un gradient de vitesse F_C pour des canaux de rapport d'aspect élevés ($w \gg h$) qui a une tendance opposée à la portance F_{GV} [38], [54];

La force de portance F_{lift} générale dans un écoulement de transition à bas nombre de Reynolds ($Re \approx 1$) est une somme pondérée de toutes ces forces.

$$F_{\text{lift}} = C_1 F_P + C_2 F_{GV} + C_3 F_{GC} + C_4 F_C \quad (3-15)$$

Les constantes C_X sont dérivées de simulations numériques qui permettent de trouver une expression empirique de la portance qui est caractéristique de chaque géométrie [57]. Cependant, comme il a été mentionné à la sous-section précédente, l'approximation de la portance par le principe de Bernoulli est suffisante pour l'analyse pire cas effectuée dans ce mémoire. Effectuer des simulations afin d'appliquer numériquement l'équation (3-15) est donc superflu.

3.2 Diffusion-réaction

Le transport d'espèces diluées se fait par le processus de diffusion, qui est la tendance de l'espèce à aller d'une région à haute concentration à une région à faible concentration afin d'équilibrer la concentration. L'équation de diffusion est une équation aux dérivées partielles (ÉDP) linéaire dérivée des lois de Fick qui décrit la dynamique de transport d'espèces diluées c dans un milieu passif. Ajouter un terme de réaction q permet de décrire la dynamique de transport dans un milieu réactif. L'équation de diffusion-réaction est présentée à l'équation (3-16). Il est possible de considérer un transport convectif d'espèces, cependant cela sort de la portée de cette analyse.

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \nabla^2 c + q(c), \quad (3-16)$$

où D est le coefficient de diffusion dans le milieu. Le terme $q(c)$ caractérise soit la génération ($q > 0$) ou la consommation ($q < 0$) de nutriments en mol/m^3s . Dépendamment de l'ordre de la cinétique de réaction d'intérêt, ce terme peut changer la linéarité de l'EDP. Voici donc différentes cinétiques pertinentes à ce mémoire présentées à l'équation (3-17).

- Une cinétique d'ordre zéro est indépendante de la concentration;
- Une cinétique de premier ordre est linéairement dépendante à la concentration;
- Une cinétique de Michaelis-Menten est d'ordre zéro pour une concentration beaucoup plus élevée que la constante de Michaelis-Menten k_M et de premier ordre pour une concentration beaucoup plus faible que k_M

$$\text{Michaelis-Menten} \left\{ q(c) = q_{\max} \frac{c}{c + k_M} \approx \begin{cases} c \gg k_M \rightarrow q_{\max} & \text{ordre zéro} \\ c \ll k_M \rightarrow q_{\max} \frac{c}{k_M} & \text{premier ordre} \end{cases} \right. \quad (3-17)$$

Dans un tissu, la consommation de nutriments par les cellules peut être décrite par une cinétique de Michaelis-Menten comme à l'équation (3-18) [66]. Dans ce cas, l'ÉDP de diffusion-réaction est non linéaire et n'a pas de solution analytique et requière donc soit (1) une simplification pour linéariser l'ÉDP (soit quand $c \ll k_M$ ou $c \gg k_M$) et la résoudre analytiquement ou (2) une résolution numérique avec la MÉF.

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \nabla^2 c + q_{\max} \frac{c}{c + k_M}, \quad (3-18)$$

Pour cette étude, la valeur du terme de réaction $q(c)$ est nulle partout sauf dans le tissu. L'analyse pire cas de deux types de nutriments permet d'établir les dimensions critiques du tissu et d'estimer combien de temps un tissu peut survivre avec un métabolisme maximum sans changement de milieu. Premièrement, les nutriments continuellement réapprovisionnés et éjectés à travers les parois de PDMS (ex. l'oxygène) définissent une valeur conservatrice du diamètre maximum de tissu viable dans un dispositif microfluidique. Deuxièmement, dans le cas de dispositifs non perfusés, le temps entre deux changements de milieux est déterminé en fonction des dimensions du dispositif et du tissu pour des nutriments seulement disponibles dans le milieu (ex. le glucose).

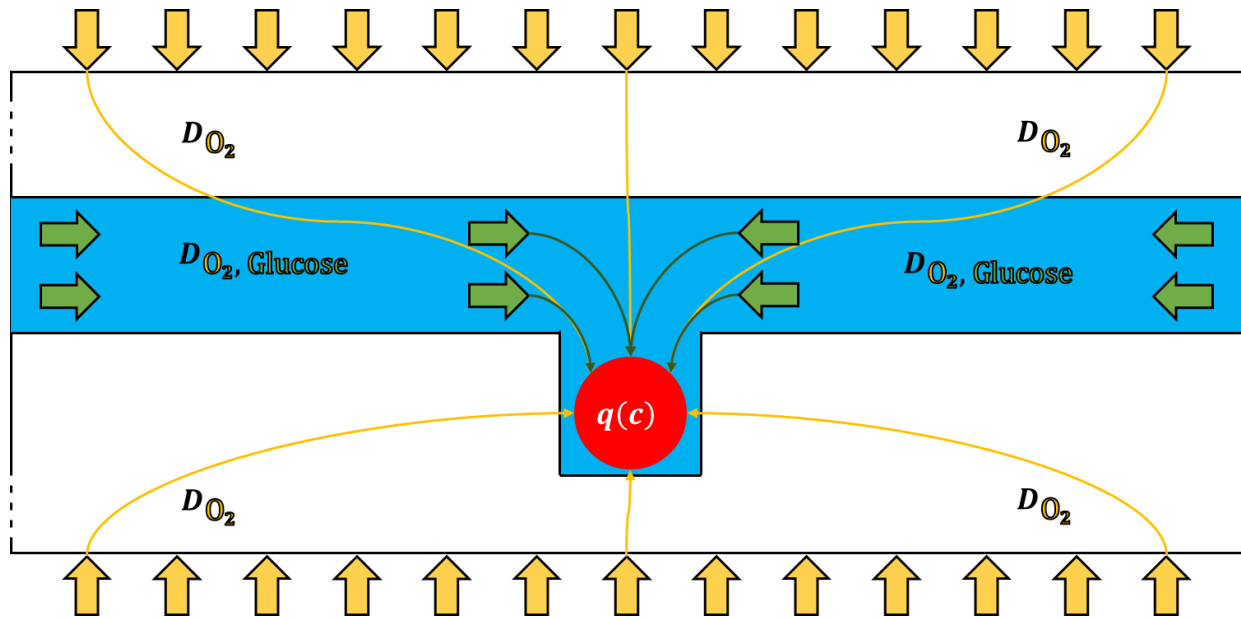


Figure 3-10 : Schéma des effets de diffusion-réaction à simuler. À la section 3.2.1, la diffusion de nutriments continuellement réapprovisionnés (ex. O_2 en jaune dans la figure) à travers les parois du dispositif et dans le milieu. À la section 3.2.2, la diffusion de nutriments réapprovisionnés par le milieu (ex. glucose en vert dans la figure) à travers le milieu et nécessitant un renouvellement du milieu de culture.

3.2.1 Nutriments continuellement réapprovisionnés

Les parois d'un dispositif en PDMS sont perméables à certains gaz, comme le dioxygène. Cela permet au milieu dans le dispositif d'avoir un apport continu de certains nutriments et de rejeter certains déchets. Dans le cas de l'oxygène, le coefficient de diffusion dans le PDMS est plus élevé que dans l'eau [67], [68]. Ceci veut dire que le flux d'oxygène à travers le PDMS est plus rapide que dans l'eau. Avec un modèle analytique pire cas simplifié, il est possible d'établir un diamètre maximum d_{\max} au-delà duquel la concentration d'oxygène au milieu d'un tissu sphérique de diamètre d est nulle. Pour cela, il faut considérer un tissu sphérique consommant l'oxygène à un ordre zéro q_{\max} dans une sphère infinie de milieu (composé majoritairement d'eau) exposée à l'infini à l'air.

L'équation (3-16) de diffusion-réaction et les conditions aux frontières pertinentes doivent être définies séparément dans le tissu T et le milieu l'entourant M ; de l'eau dans ce cas. Les suppositions suivantes sont nécessaires pour évaluer le diamètre maximum d_{\max} .

- Analyse de viabilité, donc lorsque la concentration minimum au centre du tissu est nulle;
- Régime permanent : $\partial c / \partial t = 0$;
- La sphère infinie de milieu est exposée à l'air (donc $\sim 20\% \text{ O}_2$) : $c(r \rightarrow \infty) = 0.2c_{\text{sat}}$;
- Étude en coordonnées sphériques (r, θ, ϕ) d'un tissu de diamètre d dans un milieu infini où $(0, \theta, \phi)$ est le centre du tissu et $(d/2, \theta, \phi)$ est l'interface tissu/milieu;
- Minimum de concentration à $c(r = 0)$;
- Continuité de flux d'oxygène à l'interface tissu/milieu;
- Continuité de la concentration normalisée d'oxygène à l'interface tissu/milieu;
- Consommation d'oxygène maximale (d'ordre zéro q_{max}) uniformément dans le tissu;
- Aucune consommation d'oxygène dans le milieu.

Ces suppositions permettent d'écrire le système d'équations du système avec une ÉDP pour le tissu et une pour le milieu, deux conditions aux frontières et deux conditions de continuité.

$$\begin{aligned}
 &\text{Sous-domaine du tissu, } r \in \left[0, \frac{d}{2}\right] \quad \begin{cases} \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial}{\partial r} c_T(r) \right) = \frac{q_{\text{max}}}{D_T} \\ c_T(0) = 0 \end{cases} \\
 &\text{Sous-domaine du milieu, } r \in \left[\frac{d}{2}, \infty\right] \quad \begin{cases} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial}{\partial r} c_M(r) \right) = 0 \\ \lim_{r \rightarrow \infty} c_M(r) = c_{M\text{-sat}} \end{cases} \quad (3-19) \\
 &\text{Conditions de continuité} \quad \begin{cases} D_T \frac{\partial c_T(r)}{\partial r} \Big|_{r=\frac{d}{2}^-} = D_M \frac{\partial c_M(r)}{\partial r} \Big|_{r=\frac{d}{2}^+} \\ \frac{c_T\left(\frac{d}{2}\right)}{c_{T\text{-sat}}} = \frac{c_M\left(\frac{d}{2}\right)}{c_{M\text{-sat}}} \end{cases}
 \end{aligned}$$

Où c_{sat} sont les concentrations de saturation, $c(r)$ est la concentration radiale, D est le coefficient de diffusion et q_{max} est positif et dicte la consommation de nutriment par le tissu en $\text{mol}/\text{m}^3\text{s}$ pour le tissu T et le milieu M l'entourant.

La condition de l'analyse de viabilité ($c_T(0) = 0$) rend ce système d'équations surdéterminé. Il n'est respecté que lorsque d est imposé. Ce diamètre du tissu sphérique est défini comme le diamètre maximum d_{\max} à partir duquel la concentration minimale dans le tissu est nulle. La solution du système d'équations (3-19) dans le tissu et le milieu est donnée à l'équation suivante.

$$\begin{aligned} c_T(r) &= \frac{q_{\max}}{6D_T} r^2, \quad r \in \left[0, \frac{d_{\max}}{2}\right] \\ c_M(r) &= c_{M\text{-sat}} - \frac{q_{\max} d_{\max}^3}{24D_M} \frac{1}{r}, \quad r \in \left[\frac{d_{\max}}{2}, \infty\right] \end{aligned} \quad (3-20)$$

En combinant ces équations à la condition de continuité sur la concentration normalisée, la valeur de d_{\max} est trouvée :

$$d_{\max} = 2 \sqrt{\frac{3}{q_{\max}} \left(\frac{1}{2D_T c_{T\text{-sat}}} + \frac{1}{D_M c_{M\text{-sat}}} \right)^{-1}} \quad (3-21)$$

Ce diamètre d_{\max} est le diamètre maximum au-delà duquel un tissu ne peut plus consommer de l'oxygène à un taux maximum q_{\max} et, dans le cadre de ce mémoire, d_{\max} est défini comme le diamètre à ne pas dépasser dans les simulations. Cette valeur, appliquée numériquement à la section 4.2.1.1 de l'article, vaut environ 500 μm .

3.2.2 Nutriments réapprovisionnés par le milieu

Beaucoup de nutriments sont présents dans le milieu de culture [69]. Les nutriments typiquement présents dans les sérums comprennent les sels inorganiques, acides aminés, vitamines et glucose. Dans l'analyse qui suit, seul le glucose est considéré, car il est la source d'énergie présente en plus grande quantité dans le milieu de culture *in vitro* typique. Le rôle du glucose (et d'autres sources d'énergie) sur la viabilité est décrit plus en détail à la section 3.3.2.

Quand le milieu autour d'un PMÉ est réapprovisionné, la concentration de glucose est restaurée à celle dans le milieu de culture, soit $c_0 = 11$ mmol/L pour le milieu de culture RPMI 1640 1X [69] qui est un milieu standard en culture de cellules épithéliales humaines. La dynamique de consommation de glucose doit être analysée afin d'estimer le temps minimum avant de réapprovisionner le milieu. Une étude pire cas de la consommation de glucose est suffisante pour établir ce temps.

L'équation de diffusion-réaction (3-16) définit le système en trois dimensions. Les suppositions suivantes et leurs implications permettent de simplifier le problème et de le réduire à une étude pire cas en une dimension :

- Aucun apport de nutriment par les parois du système, ce qui implique qu'il y a une condition de Neumann homogène ($\nabla c \cdot \mathbf{n} = 0$) sur toutes les parois externes du dispositif où \mathbf{n} est le vecteur normal aux parois;
- Le diamètre du tissu d et les dimensions du piège h, w sont beaucoup plus petits que la longueur du canal de réapprovisionnement L ($d, h, w \ll L$), ce qui implique que le tissu peut être réduit à un point réactif et le problème peut être réduit à une dimension;
- Le tissu consomme le glucose à un rythme maximum $q = q_{\max}$, c'est-à-dire une réaction d'ordre zéro.

L'ensemble d'équations suivantes et la Figure 3-11 représentent le problème simplifié en une dimension et ses conditions aux frontières.

$$\begin{cases} \frac{\partial c(x, t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c(x, t)}{\partial x^2} + q(x) \\ \left. \frac{\partial c(x, t)}{\partial x} \right|_{x=0} = \left. \frac{\partial c(x, t)}{\partial x} \right|_{x=L/2} = 0 \end{cases} \quad (3-22)$$

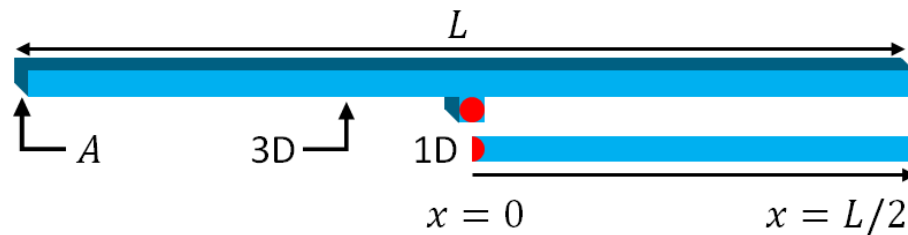


Figure 3-11 : Schéma 3D du dispositif simplifié réduit à un problème de diffusion 1D de coupe transversale A et de longueur $L/2$ pour étudier la diffusion de nutriments disponibles dans le canal

La condition de Neumann homogène à $x = 0$ est due à un axe de symétrie. Celle à $x = L/2$ est due à l'absence d'apport de nutriment par les entrées et sorties du système. De plus, la consommation de glucose $q(x)$ est nulle dans le milieu et est égale à q_{\max} dans le tissu

Une expression indépendante de la position x est retrouvée en effectuant une intégration spatiale de l'équation (3-22) et en la multipliant par 2 (pour l'axe de symétrie) et par la coupe transversale A (pour les deux autres dimensions simplifiées) :

$$2A \int_0^{L/2} \frac{\partial c(x, t)}{\partial t} dx = 2A \int_0^{L/2} D \frac{\partial^2 c(x, t)}{\partial x^2} dx - 2A \int_0^{L/2} q(x) dx, \quad (3-23)$$

$$\frac{\partial n(t)}{\partial t} = 2AD \left. \frac{\partial c(x, t)}{\partial x} \right|_{x=0}^{x=L/2} - 2A \int_0^{L/2} q_{\max} dx,$$

où $n(t)$ est le nombre de moles de glucose disponible dans le milieu en fonction du temps. Ce terme est aussi égal à la concentration moyenne de glucose $\overline{c(t)}$ multipliée par le volume du milieu $V_M \approx AL$. Avec les conditions aux frontières de Neumann homogènes, le premier terme de droite est nul et le second donne la valeur moyenne de la consommation de glucose (q_{\max}) à travers le tissu de volume $V_T \approx Ad$.

$$\frac{\partial \overline{c(t)}}{\partial t} = -q_{\max} \frac{V_T}{V_M} \quad (3-24)$$

L'expression de la concentration moyenne dans le système à un temps t est trouvée en résolvant l'équation (3-24).

$$\overline{c(0)} = q_{\max} \frac{V_T}{V_M} t + \overline{c(t)} \quad (3-25)$$

La concentration moyenne disponible initialement $\overline{c(0)}$ est directement la concentration de glucose dans le milieu de réapprovisionnement c_0 . En cherchant le temps nécessaire à la déplétion totale des nutriments dans le milieu de réapprovisionnement, donc t tel que $\overline{c(t)} = 0$, la relation suivante est retrouvée :

$$t = \frac{c_0}{q_{\max}} \frac{V_M}{V_T} \quad (3-26)$$

Pour que la supposition que $n(t) = \overline{c(t)}V_M$ soit correcte, la diffusion à travers le système doit s'effectuer à un rythme comparable ou plus élevé que la consommation par le tissu. Si elle n'est pas respectée, le temps de l'équation (3-26) doit être révisé à la baisse, soit :

$$t = \frac{c_0}{q_{\max}} \frac{V_M}{V_T} - \frac{1}{q_{\max} V_T} n(t), \quad (3-27)$$

où le terme $n(t)/q_{\max}V_T$ est caractéristique du profil de concentration à travers le dispositif, soit $n(t) = 2A \int_0^{L/2} c(x, t) dx$.

L'analyse effectuée dans l'article publié dans le cadre de ce mémoire considère des constantes de proportionnalité a et b qui prennent en compte la géométrie du système et une cinétique de réaction qui n'est pas d'ordre zéro.

3.3 Viabilité d'un modèle tissulaire 3D

Le concept de viabilité d'un tissu est plus complexe à modéliser que celui de la viabilité d'une cellule unique [53]. Expérimentalement, le pourcentage de cellules vivantes dans un tissu permet de quantifier sa viabilité. En général, les cellules en prolifération et en apoptose précoce sont considérées comme vivantes et les cellules en apoptose tardive et en nécrose sont considérées comme mortes [70]. L'essai biologique effectué pour mesurer ces nombres combine la coloration des cellules par des marqueurs fluorescents de mort cellulaire (iodure de propidium ou PI) et d'apoptose précoce (annexine V) à la cytométrie en flux qui trie des cellules marquées par fluorescence (FACS) [71]. Le résultat type de ce genre d'essai est présenté à la Figure 3-12 et donne la proportion du tissu qui est vivant.

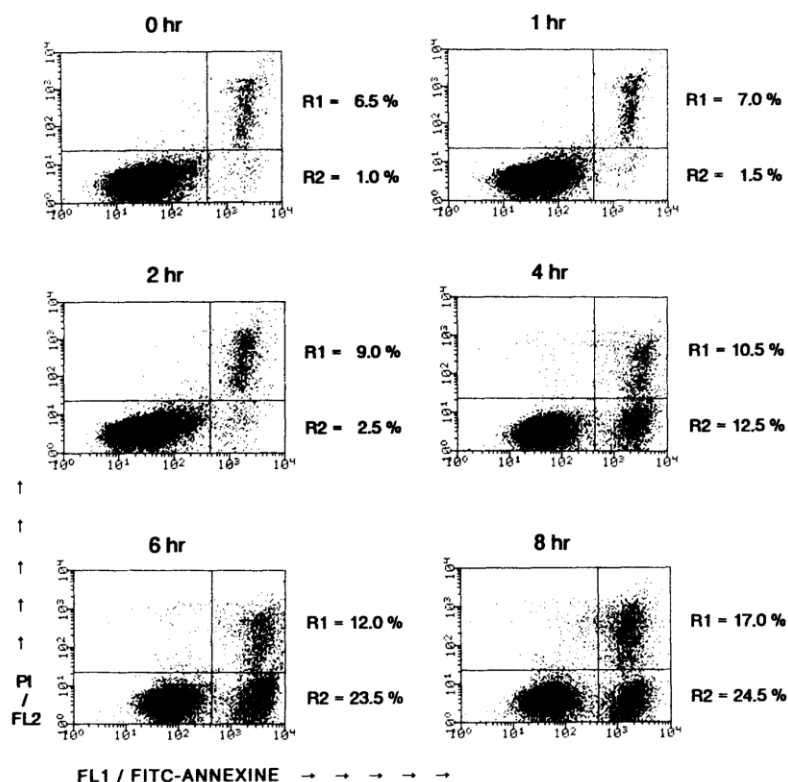


Figure 3-12 : Exemple type d'un essai par Annexin V/iodure de propidium pour déterminer le nombre de cellules en santé (quadrant en bas à gauche), en apoptose précoce (quadrant en bas à droite), en apoptose tardive (quadrant en haut à gauche) et mortes (quadrant en haut à droite) [71]. L'axe des abscisses présente l'expression de l'annexine V et l'axe des ordonnées présente l'expression du PI. Figure reproduite avec permission.

En pratique, lorsqu'un dispositif microfluidique est utilisé pour évaluer l'efficacité d'un médicament sur un modèle tissulaire 3D, la viabilité d'un tissu traité est comparée à la viabilité d'un tissu non traité. Le tissu non traité est le « contrôle » de l'expérience. Si le contrôle n'est pas viable, les résultats biologiques provenant du dispositif ne sont pas concluants. Il est alors nécessaire d'assurer que la viabilité du tissu de contrôle ne soit pas affectée par une utilisation normale du dispositif microfluidique. Si la viabilité est affectée par une utilisation normale, le dispositif biaise les résultats biologiques. Avec une opération normale d'un dispositif, la viabilité de tissus peut être affectée principalement par deux effets : une contrainte de cisaillement trop élevée ou un appauvrissement en nutriments.

3.3.1 Effet de la contrainte de cisaillement

In vivo, les cellules sont exposées à des contraintes de différents types et ordres de grandeur dépendamment du tissu d'où elles proviennent. Les quatre types de tissus retrouvés dans les corps animaux, les contraintes appliquées *in vivo* et leur réaction *in vivo* à ces contraintes, tirées de [53], sont :

- Tissu conjonctif (cellules séparées par une matrice extracellulaire) comme les tendons, ligaments, cartilage, os, tissus adipeux, sang et derme :
 - Contraintes de compression, tension et cisaillement qui causent un alignement des cellules dans le cas de cartilages et d'os;
 - Contraintes cycliques qui augmentent la prolifération, l'alignement et l'expression génique des tendons;
 - Contrainte de tension constante qui induit la prolifération et la transformation de la matrice extracellulaire pour la peau;
 - Contraintes de cisaillement cycliques qui n'ont pas d'effets sur le phénotype des cellules pour les tissus cardiaques;
- Tissu épithélial (cellules jointives) qui couvre la surface des organes et comprend les glandes : Contraintes de cisaillement cycliques qui induisent la prolifération et le renforcement des tissus.
- Tissu musculaire (cellules contractiles) : Exposés à des contraintes de tension et compression axiales qui stimulent l'activité métabolique, la régulation des gènes et l'expression protéique qui ont comme effet une augmentation de la prolifération et un alignement des cellules.
- Tissu nerveux (composé de neurones) : Normalement exposés à peu ou aucune contrainte *in vivo*. Une elongation traumatique d'aussi peu que 11% peut causer des dommages irréversibles et une perte de conductivité des impulsions nerveuses sur la longueur du tissu nerveux [72].

En général, les tissus réagissent aux stress auxquels ils sont soumis de telle façon qu'ils puissent mieux y survivre : ils s'y adaptent si assez de temps leur est donné [53]. Si un stress faible

ou modéré est appliqué, le tissu s’y adapte en se renforçant. Si un stress excessif est appliqué, le tissu n’a pas l’opportunité de s’y adapter et est endommagé.

Dans le cadre de ce mémoire, les contraintes en tension et compression ne sont pas considérées, car elles sont minimales dans un PMÉ comparées aux valeurs *in vivo*. Cependant, dans des dispositifs microfluidiques, la contrainte de cisaillement peut excéder les valeurs mesurées *in vivo* (de 2 Pa dans des cas extrêmes *in vivo*). Selon les résultats rapportés dans la littérature, il y a essentiellement trois régimes de croissance cellulaire en fonction de la contrainte de cisaillement ressentie par les tissus.

- Sans flux où les cellules croissent normalement de façon isotrope.
- Flux générant des contraintes biologiques (i.e. le cisaillement dû au passage du sang), généralement en deçà de 1 Pa. Dans ce régime, le métabolisme des cellules est stimulé [73] afin d’ajuster leur morphologie au cisaillement. Elles croissent de façon anisotrope et s’allongent en direction du flux imposé [74], augmentant leur résistance [75].
- Flux générant des contraintes impossibles naturellement *in vivo* de l’ordre de 10 Pa et plus. À ces niveaux, le cisaillement est trop élevé pour permettre aux cellules d’ajuster leur morphologie [76]–[78]. Ces contraintes de cisaillement peuvent induire l’apoptose [79], inhiber la prolifération [80] ou enlever des cellules adhérentes [77], [81].

En plus des effets de la valeur absolue du cisaillement, reproduire l’effet cyclique du pompage de sang par le cœur a aussi un impact sur la prolifération et la viabilité des cellules [82], [83]. Cependant, peu de dispositifs microfluidiques considèrent cet effet qui est généralement négligé [53]. La contrainte τ_{\max} critique telle que définie aux équations (3-9) et (3-10) est fixée à un seuil conservateur de 1 Pa [76]–[78] pour les analyses pire cas de ce mémoire.

3.3.2 Effet de l’appauvrissement en nutriments

Le métabolisme cellulaire est l’ensemble des réactions permettant à un organisme de vivre et de se reproduire. L’énergie requise pour les activités métaboliques est tirée de l’adénosine triphosphate (ATP), générée par le cycle de l’acide citrique (ou cycle de Krebs), la glycolyse et la consommation de lactate. La première étape de la respiration cellulaire est la glycolyse, qui ne nécessite pas d’oxygène et génère l’acide pyruvique nécessaire pour la seconde étape. Cette seconde étape est le cycle de Krebs qui génère la majorité de l’ATP. Un apport d’oxygène supérieur

à la consommation de glucose est considéré comme un métabolisme optimal transformant la totalité du glucose en ATP.

Les nutriments essentiels à la respiration cellulaire, source principale d'ATP, se réduisent à l'oxygène et au glucose [84], [85]. Certains modèles de croissance cellulaire considèrent aussi le lactate [86]. Quand un tissu biologique manque de nutriments, sa réponse varie dépendamment de quel type et ordre de grandeur est la carence. La réponse des voies métaboliques de création d'ATP à une carence est présentée à la Figure 3-13. L'ATP est utilisée en majorité pour la multiplication cellulaire et la relation entre l'ATP et la croissance cellulaire est régie par l'équation de Monod qui est analogue à l'équation de Michaelis-Menten (3-17). L'équation de Monod a la forme suivante [87], [88] :

$$\mu(Q_{ATP}) = \mu_{\max} \frac{Q_{ATP}}{Q_{ATP} + k_{ATP}}, \quad (3-28)$$

où le taux de croissance μ dépend du taux de génération d'ATP Q_{ATP} , du taux maximum de croissance μ_{\max} et de la constante critique k_{ATP} à laquelle le taux de croissance est à la moitié du taux maximum.

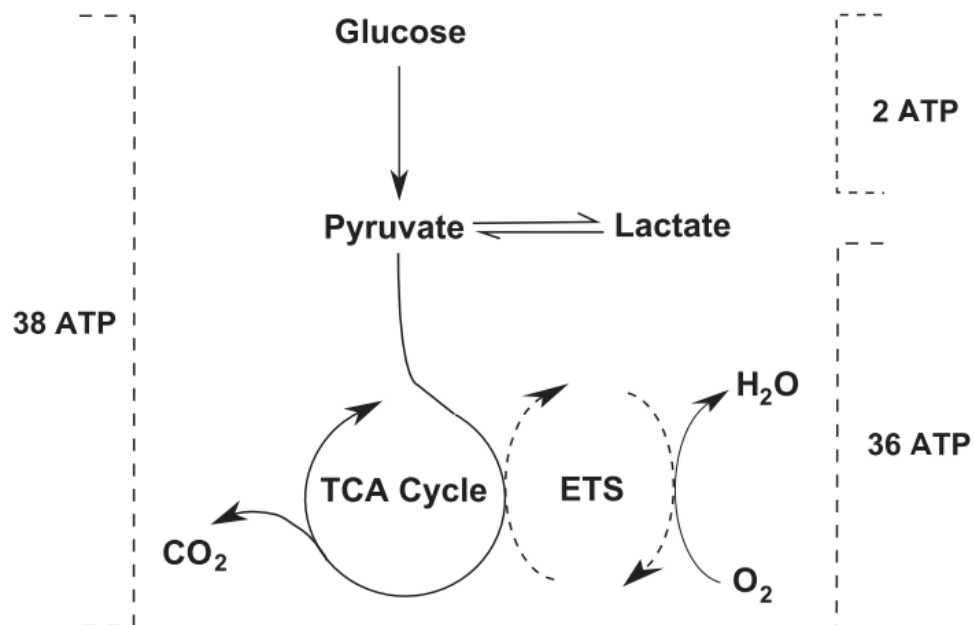


Figure 3-13 : Voies principales du métabolisme énergétique qui considèrent le glucose, le lactate et l'oxygène. En manque d'oxygène, le glucose excédant est emmagasiné sous forme de lactate.

En manque de glucose, le lactate emmagasiné est consommé. Le lactate n'est pas critique au métabolisme énergétique. Tiré de [86] et reproduit avec permission.

En manque d'oxygène, l'acide pyruvique généré par la glycolyse est réduit en lactate qui s'accumule dans la cellule. Cette réduction génère peu d'ATP. En manque de glucose, le lactate accumulé est utilisé comme source alternative d'énergie. En conditions anaérobiques partielles ou en manque de glucose partiel, les cellules entrent en quiescence (G_0) : la quiescence est une étape du cycle cellulaire (Figure 3-14) où le métabolisme est radicalement réduit pour protéger la cellule de conditions non favorables à la multiplication cellulaire. En conditions anaérobiques totales, les cellules ne peuvent plus générer assez d'ATP pour soutenir leur métabolisme et, si laissées trop longtemps dans cet état, entrent en apoptose.

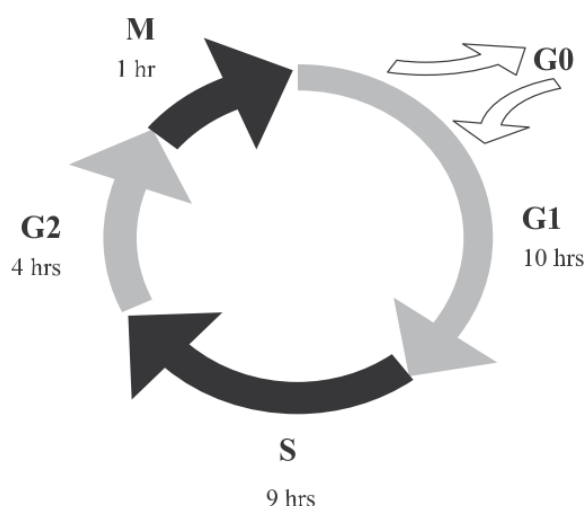


Figure 3-14 : Phases du cycle de division cellulaire. Les durées typiques de chaque phase sont données pour des cellules mammaliennes pour 24 heures au total. S = phase de synthèse d'ADN, M = mitose, $G1$ et $G2$ sont des phases de suspension ou de « gap », $G0$ = état de quiescence (sans division) « dormant » où les cellules peuvent rester indéfiniment. Reproduit avec permission.

Certains modèles mathématiques de viabilité cellulaire considèrent aussi la croissance d'un tissu due à la division cellulaire [88]. La fréquence de division cellulaire est approximativement 24 h pour des cellules mammaliennes dans des conditions optimales [89]. Le modèle mathématique simplifié de la dynamique de croissance [88] est résumé par le diagramme de processus suivant :

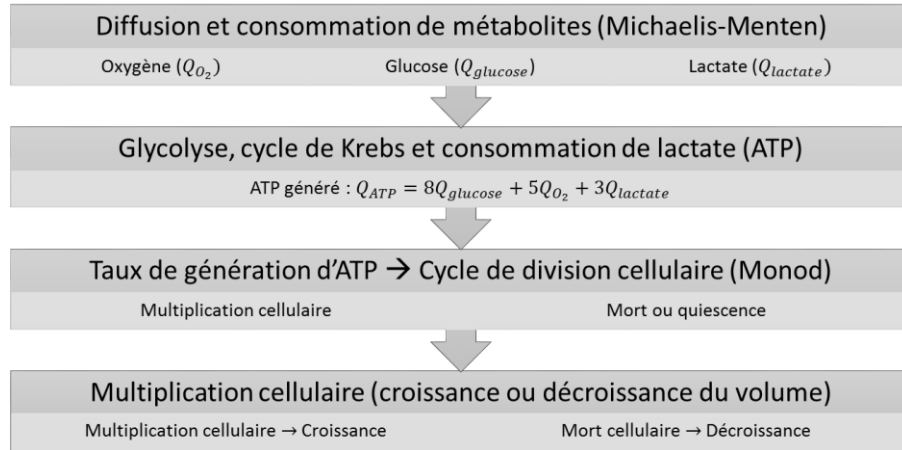


Figure 3-15 : Schéma de modélisation de la croissance d'un tissu. Les métabolites (oxygène, glucose et lactate) sont consommés à un certain taux Q . Ce taux donne directement le taux de génération de l'ATP Q_{ATP} [88]. Le taux de génération d'ATP est traduit en une multiplication ou une mort cellulaire. Dépendamment du sort de la cellule, le volume du tissu croît ou décroît.

Le type de modèle présenté à la Figure 3-15 est caractéristique de la modélisation multiéchelle de la croissance de tissus. La modélisation multiéchelle est une nouvelle solution de plus en plus populaire en biologie computationnelle [53], [88], [90], [91]. Dans le cadre de ce mémoire, le modèle multiéchelle de croissance cellulaire a été mis de côté pour un modèle plus simple qui ne considère que la consommation et la diffusion de nutriments. En mettant ce modèle de croissance de côté, les simulations de diffusion omettent la dynamique de croissance des tissus *in vitro* et l'information sur la vie ou la mort cellulaire dans le tissu. Supposer que les tissus ont une dimension fixe ignore la demande métabolique croissante pendant leur culture. De plus, l'absence d'information sur la viabilité implique que seule la dynamique du métabolisme peut être suivie. De cela, l'information tirée de ces modèles simplifiés est le temps pendant lequel un tissu consomme des nutriments avec un métabolisme maximum.

Dans cette optique, les concentrations critiques de nutriments sont définies sur le taux de métabolisation des nutriments au lieu d'être définies par la mort cellulaire. En supposant une cinétique de consommation de Michaelis-Menten (3-17) par les cellules, la concentration critique dans l'article publié dans le cadre de ce mémoire est la constante de Michaelis-Menten k_M . À cette concentration, le taux de consommation de nutriments est égal à la moitié du taux de consommation maximal q_{\max} . En deçà de k_M , même si les cellules sont encore en vie et consomment toujours des nutriments, elles sont considérées dans un état critique.

Contribution scientifique des modèles du Chapitre 3

L'analyse de ce chapitre circonscrit une suite de simulations dont les résultats sont inclus dans l'article du Chapitre 4 et ont été publiés en partie dans l'article de Mélina Astolfi et al. [22]. Les paramétrisations nécessaires (définies dans la Méthodologie du Chapitre 1) sont définies. Toutes les simulations demandent une **paramétrisation des dimensions du dispositif et du tissu** telles que schématisées à la Figure 1-3 et à la Figure 4-2. Ces balayages paramétriques génèrent des diagrammes de phase d'opération et de design qui traduisent une manipulation désirable ou indésirable du dispositif (temps d'attente et débits trop faibles ou élevés). La Figure 4-3 présente graphiquement ces phases d'opération de PMÉ en rouge, orange et vert.

Effets hydrodynamiques (temps de piégeage, Q_{shear} , Q_{lift})

L'analyse du temps de piégeage (section 3.1.1) demande une **paramétrisation de la condition de vitesse aux frontières** et une **paramétrisation du solutionneur** afin qu'il s'interrompe au moment où la force réactive du fluide sur le tissu (frottement visqueux) équivaut à la force gravitationnelle (section 4.2.1.2). Cela permet de retrouver le temps de sédimentation en fonction du diamètre du tissu par rapport aux dimensions du piège.

L'analyse du cisaillement dommageable et de l'éjection des tissus (sections 3.1.2 et 3.1.3) demande une **paramétrisation du débit du fluide Q_e** et une **paramétrisation du solutionneur** afin qu'il s'interrompe aux moments où le taux de cisaillement maximum sur le tissu excède τ_{max} défini à la section 3.3.1 et où la force réactive du fluide sur le tissu (force de portance) excède la force gravitationnelle sur le tissu (sections 4.2.1.3.1 et 4.2.1.3.2). Cela permet de retrouver les débits critiques de cisaillement Q_{shear} et de portance Q_{lift} en fonction des dimensions du dispositif.

Effets de diffusion-réaction (d_{max} et temps de réapprovisionnement du milieu)

L'analyse des nutriments réapprovisionnés par le milieu (section 3.2.2) demande une **paramétrisation du solutionneur temporel** afin qu'il s'interrompe au moment où la concentration de glucose tombe en deçà de k_M défini à la section 3.3.2 (section 4.2.1.4.2). Cela permet de retrouver le temps requis pour changer le milieu de culture.

Enfin, les modèles biologiques complexes de la section 3.3.2 peuvent être utilisés afin de modéliser précisément la viabilité de tissus en créant un programme avec l'application *MATLAB*. Ce dernier élément est une piste d'étude supplémentaire intéressante.

CHAPITRE 4 ARTICLE 1 : SIMULATION-ASSISTED DESIGN OF MICROFLUIDIC SAMPLE TRAPS FOR OPTIMAL TRAPPING AND CULTURE OF NON-ADHERENT SINGLE CELLS, TISSUES, AND SPHEROIDS

4.1 Présentation de l'article

Ce chapitre présente l'article scientifique écrit dans le cadre de ce mémoire. Cet article présente les résultats des simulations numériques et balayages paramétriques qui viennent corroborer les résultats analytiques des effets hydrodynamiques et de diffusion-réaction présentés précédemment. L'article est au cœur du travail effectué dans le cadre de ce mémoire : l'optimisation du design et de l'opération de PMÉ. La contribution de l'auteur principal à la réalisation de cet article comprend la recherche bibliographique, le développement de tous les modèles analytiques, la production, l'analyse et la présentation des résultats, la création des figures et tableaux et l'écriture du manuscrit.

Cet article a été soumis à la revue *Scientific Reports* le 11 août 2016 et le numéro de référence de la soumission est le SREP-16-29456. Cette revue a été choisie, car son type de publication (libre accès en ligne) permet de maximiser l'accessibilité et la visibilité de l'article. La revue est publiée par le *Nature Publishing Group*, connu pour sa publication vedette *Nature*.

La nature interdisciplinaire du travail sera d'intérêt pour (1) la communauté microfluidique, les concepteurs de dispositifs qui conçoivent sans cesse des systèmes de piégeage et d'éjection d'échantillons sur puce adaptés aux dimensions des échantillons, (2) la communauté des sciences de la vie, les utilisateurs finaux (biologistes ou cliniciens) qui développent de nouveaux essais biologiques, et (3) la communauté de modélisation mathématique, car l'étude utilise des méthodes mathématiques avancées et des balayages paramétriques.

Les auteurs de cet article sont Nassim Rousset, Frédéric Monet et Thomas Gervais, tous membres du département de génie physique de l'École Polytechnique de Montréal. Le professeur Thomas Gervais est aussi affilié à l'Institut de génie biomédical, à l'Institut du Cancer de Montréal (ICM), et au Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM).

4.2 Simulation-assisted design of microfluidic sample traps for optimal trapping and culture of non-adherent single cells, tissues, and spheroids

Nassim Rousset¹, Frédéric Monet¹, Thomas Gervais^{1,2,3,*}

¹ Department of Engineering Physics, Polytechnique Montréal, Montreal, QC, Canada

² Institut de génie biomédical, Polytechnique Montréal, Montreal, QC, Canada

³ Institut du cancer de Montréal and Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montreal, QC, Canada

* thomas.gervais@polymtl.ca

This work focuses on modelling design and operation of “microfluidic sample traps” (MSTs). MSTs regroup a widely used class of microdevices that incorporate wells, recesses or chambers adjacent to a channel to individually trap, culture and/or release submicroliter 3D tissue samples ranging from simple cell aggregates and spheroids, to *ex vivo* tissue samples and other submillimetre-scale tissue models. Numerous MST designs employing various trapping mechanisms have been proposed in the literature, spurring the development of 3D tissue models for drug discovery and personalized medicine. Yet, there lacks a general framework to optimize trapping stability, trapping time, shear stress, and sample metabolism. Herein, the effects of hydrodynamics and diffusion-reaction on tissue viability and device operation are investigated using analytical and finite element methods with systematic parametric sweeps over independent design variables chosen to correspond to the four design degrees of freedom. Combining different results, we show that, for a spherical tissue of diameter $d < 500\mu\text{m}$, the simplest, closest to optimal trap shape is a cube of dimensions w equal to twice the tissue diameter: $w = 2d$. Furthermore, to sustain tissues without perfusion, available medium volume per trap needs to be $100 \times$ the tissue volume to ensure optimal metabolism for at least 24 hours.

Three-dimensional tissue models, ranging from spheroids to *ex vivo* samples of larger xenografts or even human tissues, are currently under extensive development to provide more biologically relevant preclinical models for personalized medicine and biopharmaceutical research^{1–3}. The field of microfluidics has so far provided a large number of technical solutions to facilitate the trapping, culture and analysis of these tissues^{2,4–6}. An increasingly popular class of device to achieve this is the microfluidic sample trap (MST). As it is defined herein, MSTs are any device that allow to

individually trap micrometre to millimetre-scale cell and tissue samples in a channel recess, hanging drop, or small chamber adjacent to a main channel where samples circulate in a carrier fluid (Figure 4-1). They can be used to load samples or simply grow them within the trap from injected cell suspensions as in spheroid synthesis. The trapping mechanisms to load samples within the device vary depending on the design (Figure 4-1A) and can combine many mechanisms studied by different authors, such as i) sedimentation trapping, where waiting for the tissue to settle into an extrusion from a channel traps it⁷⁻¹⁰; ii) resistive trapping, which exploits preferential flow to guide samples into traps¹¹⁻¹⁶; iii) inertial trapping, which uses focusing flows or sharp turns to trap samples in channel recesses¹⁷⁻¹⁹; iv) dielectrophoretic trapping, where the difference in permittivity between the fluid and tissue is exploited to trap it in an electric field^{20,21}; v) and open-microfluidic channel networks, which create hanging droplets in which samples are trapped or synthesized^{22,23}.

In most designs, the trap itself allows tissues to be somewhat shielded from potentially damaging shear stress because the fluid velocity in it is only a fraction of what it is in the adjacent channel⁸. Although reflow of channel fluid in the trap is minimal, the small scale of the device allows the diffusion of nutrients and other species to occur quickly from the channel to the trap (and, conversely, diffusion of waste from the trap to the channel) relative to culture times. The relatively small design dimensions also allow to put a large number of traps (> 100) within the same channel⁹. Additionally, if the device is made with a material porous to air (e.g. PDMS), it allows oxygen to be supplied throughout the experiment without requiring medium perfusion; while supplying other nutrients and purging waste require perfusion or periodic medium change^{24,25}. Finally, making the device with a transparent material (e.g. glass, PDMS) allows observation and analysis of samples in the device by different types of microscopy and wide field imaging²⁶. All of these points show how MSTs are particularly effective at sustaining, treating and analysing large numbers of samples simultaneously.

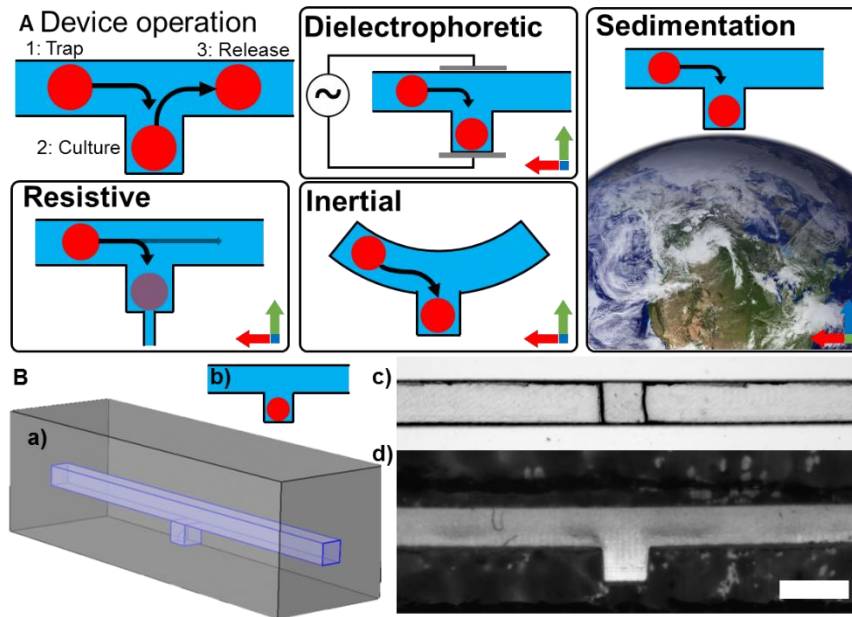


Figure 4-1: Basic MST designs: (A) MST operation with schematics of different trapping mechanisms: resistive, dielectrophoretic, inertial and sedimentation trapping; blue axis is parallel to gravity. The picture of the western hemisphere of earth on a transparent background was solely created by NASA and is in the public domain in the United States. (B) Simplified 3D (a) and 2D (b) MST design with a top (c) and side (d) view of a PDMS chip with these features; scale bar is 1 000 μm .

Furthermore, even without perfusion, the viability of *in vitro* or *ex vivo* 3D tissue model samples has been shown not to be affected for sufficiently small tissues and with periodic medium change^{10,24}. The present study focuses on 3D tissue model sample culture in the absence of perfusion for three reasons: (1) studying non-perfused devices provides a worst-case evaluation of tissue viability; (2) integrating flow pumps to perfuse hundreds of samples simultaneously inside an incubator can be a barrier to adopting the technology by non-specialized users; (3) controlling small devices with large external pumps is counterintuitive to the miniaturization process. In the case of devices that are designed to not require perfusion, convection-based transport and metabolite diffusion are decoupled because they happen on different timescales. Convective effects occur briefly during loading, unloading and medium changes, and diffusive effects occur throughout the experiment.

Although designs and their trapping mechanisms vary, the simplest is a cubic extrusion from a channel or a well as Figure 4-1B shows in three dimensions (a) and two dimensions (b). Figure 4-

1B shows a cross-section of such a simple sedimentation trap made with PDMS¹⁰ viewed from the top (c) and the side (d). Figure 4-1A shows the basics of this device's operation in its most fundamental form. In all cases, the trapping mechanism is caused by volume forces (F_V) acting on samples, yielding an effective force towards the trap. Loading 3D tissue model samples into the device is done through the channel by applying a flow rate at the entrance or suctioning at the outlet and waiting some time to let the samples enter the trap. With a non-perfused design, as is the case in this analysis, it is necessary to change the medium periodically to replenish nutrients and evacuate sample excretions in the channel as it is cultured. All these aspects of device operation (trapping times, flow rates and medium replenishment) must be tuned to ensure that the device itself does not bias tissue viability.

This article aims to simplify MST design by studying different physical constraints (settling times, shear stress, lift forces, nutrient availability) that depend on device design and affect its operation (applied flow rates and medium replenishment frequency). To do so, analytical models are developed and compared to numerical models solved with a combination of the finite element method and broad parametric sweeps over all main design variables. The hydrodynamic models study non-adherent sample trapping and ejection dynamics for samples of similar sizes to the trap. The various diffusion-reaction models use experimental data on metabolite transport kinetics compiled from relevant cell-based studies. With these parametric sweeps, the results can be applied to many devices because the concept of a channel containing extrusions or wells that permit the trapping, culture, analysis, and release of single cells, spheroids and tissues has been applied in diverse scales. We demonstrate how and why these devices work and how to design them to achieve optimal operation for specific applications.

4.2.1 Finite element methodology

The finite element method is used in this work to model the device and simulate the effect of device design on device operation and tissue viability. The 3D geometry as shown in Figure 4-1B was drawn, meshed, and different effects were solved numerically with COMSOL Multiphysics® v.5.2 (COMSOL AB, Stockholm, Sweden) run on a calculation server with dual Intel Xeon E5-2695V2 (2.4GHz 12 core CPU) and 128GB of RAM (Cyberlogic, Montreal, Canada). The software was chosen for its ability to easily do and analyse parametric sweeps with the built-in tools. COMSOL's

built-in probe functions, reactive force operators and the customizable parametric sweeps with stop conditions were key tools to produce the results.

4.2.1.1 Model parameters and variables

There are three classes of design parameters in this study: parameters that affect device operation, parameters that do not affect device operation and tissue parameters.

Device operation, meaning imposing a flow rate in the channel (to trap and release tissues or change channel medium) and refreshing metabolite concentration in the channel (to keep tissues alive), is affected by the following design parameters shown in Figure 4-2B: well parameters as in well height (h) and well cross-section ($w \times w$); and channel parameters as in channel length (distance between two traps) (L), channel cross-section (A) and channel volume (V). The available medium volume per trap V_M is approximately equal to the channel volume V if $L \gg w$.

The design parameter that does not affect device operation is PDMS thickness which is set at 3 mm, a value typically found in standard applications and not critical to derive most results.

The variability of tissue uptake parameters (tissue cellular density – inverse of cell size –, uptake rate and Michaelis-Menten constant) in literature is presented in Table 4-1 for two nutrients essential to metabolism: glucose and oxygen. These parameters are pertinent but not essential for a diffusion analysis because they can be estimated in a worst-case approximation. For a fluid dynamics analysis, the only tissue parameter that is required is tissue diameter d , as shown in Figure 4-2B, which is known by the type of tissue being trapped.

<i>Tissue uptake parameters</i>		Minimum	Maximum	Typical
<i>Tissue cellular density ρ_{cell} (cells/μL)</i>		2.1×10^5 , ⁴³	4.0×10^5 , ⁴⁴	2.8×10^5
<i>Maximum cellular uptake rate q_{max} (mol/cells \cdot s)</i>	Glucose	2.7×10^{-18} , ⁴⁵	2.5×10^{-16} , ⁴⁶	3.9×10^{-17}
	Oxygen	1.7×10^{-18} , ⁴⁷	7.0×10^{-16} , ⁴⁸	7.4×10^{-17}
<i>Michaelis-Menten constant k_M (mM)</i>	Glucose	4×10^{-2} , ⁴³	6×10^{-2} , ⁴⁵	4×10^{-2}
	Oxygen	4.6×10^{-3} , ⁴⁶	6.9×10^{-3} , ⁴⁹	4.63×10^{-3}
<i>Diffusion constant of O_2 D_x (cm²/s)</i>	Medium	2×10^{-5} , ⁵⁰	3.35×10^{-5} , ⁴⁸	2.44×10^{-5}
	Tissue	9.5×10^{-6} , ²⁹	3.6×10^{-5} , ⁵¹	1.85×10^{-5}
<i>Saturation concentration of O_2 c_{x-sat} (mM)</i>	Medium	-	-	0.21, ¹⁰
	Tissue	-	-	1.02, ^{29,52}

Table 4-1: Tissue uptake parameters found in literature for various cell types and the typical value used in the models

For diffusion parameters, oxygen diffuses through PDMS easier than through water^{27,28} as the diffusion constant of PDMS (ranging from 3.25×10^{-5} cm²/s ²⁷ to 7.88×10^{-5} cm²/s ²⁹) is higher than that of water (ranging from 1.80×10^{-5} cm²/s at 20°C to 2.78×10^{-5} cm²/s at 40°C ³⁰). Thus, a simplified diffusion-reaction model of an oxygen consuming spherical tissue in an infinite sphere of water provides a worst-case analysis of oxygen supplied through the gas-permeable PDMS walls of the device. This simplified model approximates the *maximum viable tissue diameter* (d_{max}) to prevent anoxia¹⁰:

$$d_{max} = 2 \sqrt{\frac{3}{q_{max}\rho_{cell}} \left(\frac{1}{2D_T c_{T-sat}} + \frac{1}{D_M c_{M-sat}} \right)^{-1}} \approx 500 \mu\text{m}, \quad (1)$$

where D is the diffusion constant in the medium (M) or tissue (T), c_{sat} is the saturation constant, q_{max} is the maximum uptake rate and ρ_{cell} is the tissue cellular density in cells/ μ L. The value of d_{max} sets the maximum value for tissue size in the numerical simulations and parametric sweeps.

To study the effect of design parameters that affect device operation, they must be modified independently with broad parametric sweeps in the numerical models that lead to as many degrees of freedom of the analysis as there are design parameters. These degrees of freedom must be minimized to a set of core “design variables” (DV) to reduce redundancies. Figure 4-2C shows the DVs circumscribed in this article. The primary DV is scaling the device down from its maximum size determined by d_{max} (Figure 4-2C.a), which adjusts the device for applications going from single-cell trapping to millimetre-scale 3D tissue model sample trapping. The secondary DV is varying tissue size within a trap of given dimensions (Figure 4-2C.b), which gives insight on sample behaviour that have a deviation from average dimensions since tissues are never all uniform

in size. The tertiary DV is varying trap depth (Figure 4-2C.c), which describes sample behaviour based on the trap shape; a tissue in an elongated trap will behave differently from a tissue in a shallow trap. The final DV that is used solely for diffusion models is the inter-well separation (Figure 4-2C.d) which governs how densely multiple traps can be juxtaposed. The broad parametric sweeps performed on the four DVs lead to four series of over a thousand simulations each that have been graphically represented in Figures 3C through E and Figure 4C. A small sample of one such series for the secondary DV is provided (see Supplementary video online).

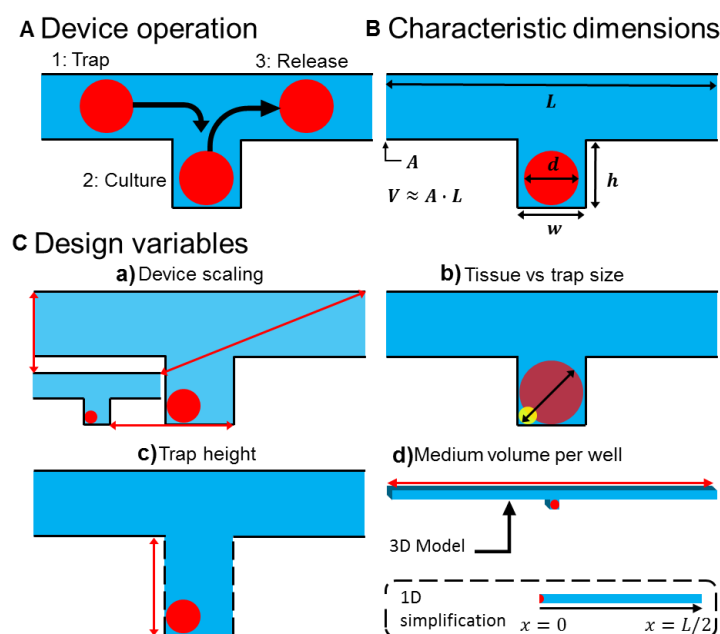


Figure 4-2: MST simulation methodology: (A) Sample traps operation schematic: (1) trapping of a tissue, spheroid or cell suspensions using any trapping mechanism (typically with volume forces), (2) culture, growth, treatment and in-vitro analysis of the tissues, and (3) release, ejection or collection of the samples from the traps for external analysis (e.g. flow cytometry). (B) Characteristic dimensions of the device with: L the inter-well separation, A the channel cross-section, V the available medium volume per well, d the tissue diameter (assuming a spherical tissue), w the well size (assuming a square well) and h the well depth. (C) Degrees of freedom for designing the device: (a) scaling the device up and down while keeping the tissue size constant compared to the well size, (b) scaling the tissue size while keeping all other dimensions constant, (c) scaling the trap height while keeping all other dimensions constant, and (d) scaling the available medium volume per well while keeping all other dimensions constant (inset shows the 1D simplification of the device for analysing diffusion of metabolites).

4.2.1.2 Tissue trapping

Tissue trapping encompasses the dynamics of tissues settling in a liquid-filled trap due to a volume force \mathbf{F}_V ; with buoyancy, this force is $\mathbf{F}_V = (\rho_T - \rho_M)V_T\mathbf{g}_{eff}$. With ρ the density of the tissue (T) and medium (M), V the volume and \mathbf{g}_{eff} the effective acceleration. In this study, gravity is assumed as the driving force \mathbf{F}_V but could be replaced by any of the volume forces shown in Figure 4-1A.

Sedimentation of a solid spherical tissue of diameter d in a reservoir with dimensions comparable to its diameter is more complex than that of a sphere falling in an infinite medium. The drag force on a settling sphere increases with the ratio of the sphere cross-section on the reservoir cross-section in the direction of sedimentation³¹. To model this effect, the reference frame is changed to that of the settling sphere³². A sphere settling in a long prism (Figure 4-3A inset) thus becomes an immobile sphere in a moving long prism with a moving wall boundary condition. The reactive force on the tissue (i.e. drag force in this referential) is found numerically with the *reactf* operator built into COMSOL. In the case of computational fluid dynamics, this operator evaluates the net vector force of flow on boundary nodes. The reactive force is found by summing this operator over all boundary nodes of the tissue.

With a parametric sweep on the moving wall velocity, the numerically evaluated drag force must be equal to the driving force on the sphere at which point the moving wall velocity is considered equal to the tissue settling speed. This method results in finding the settling speed v_{set} comparable to equation (3) and shown in Figure 4-3A.

4.2.1.3 Effect of fluid dynamics on tissues

As the results in Figure 4-3B show, when a flow rate is applied in the channel, the tissue is pinned upstream by fluid recirculation within the trap. Thus, fluid dynamics effects are modelled with the spherical tissue upstream in the trap. This phenomenon has been studied for smaller particles in similar geometries⁸. Similar experimental observations were made using Polyethylene Microspheres in sedimentation traps such as those of Astolfi et al.¹⁰ (see Supplementary video online). Additionally, since the tissue is pinned upstream, as the tissue lifts it is increasingly driven by vertical flow, thus increasing lift. This means that once the tissue takes off, it is very quickly ejected from the trap. These results are summarized in Figure 4-3B through 3E.

For the numerical models, except when specified otherwise, walls are set with no slip (Dirichlet) boundary conditions on fluid velocity. The device is operated with a constant flow (Q) at the inlet and no stress ($p = 0$ Pa) at the outlet.

4.2.1.3.1 Critical flow rates to generate potentially damaging shear stress (Q_{shear})

The maximum value of the numerically solved shear rate over the surface of the tissue, multiplied by the fluid's dynamic viscosity, gives the maximum shear stress on the tissue. To find the critical maximum flow (Q_{shear}), the inlet flow rate (Q) is swept up until the maximum value of the shear stress (τ) exceeds physiological levels of 1 Pa^{33–35}. Above this conservative value, cells are considered damaged as shear stress affects cellular phenotype³⁶ and may induce apoptosis³⁷, inhibit proliferation³⁸ or remove adherent cells³⁴. This method results in numerically finding the critical maximum flow rate that induces damaging shear (Q_{shear}).

4.2.1.3.2 Critical flow rates to lift tissues (Q_{lift})

With large enough channels or high enough flow rates, Reynolds numbers can climb to reach transitional flow regimes which may generate lift forces that eject tissues. If the critical flow rates to reach those regimes are of the same order as loading flow rates, trapping stability is affected negatively. In other circumstances, this lift effect can be desirable and exploited to intentionally eject tissues from their traps. Numerically evaluating the net vertical force of the fluid onto the tissue resting at the bottom of the trap gives the lift force experienced by the tissue. Similar to finding the drag force for settling tissues, using the reaction force operator built into COMSOL gives the net vector force on the tissue. The vertical component gives the lift force, the longitudinal component gives the pinning force and due to symmetry the transversal component is null. If the lift force exceeds the net force pulling the tissue down (gravitational pull and buoyancy), then the associated flow rate is marked as being Q_{lift} . This method results in finding the minimum critical lift flow rate (Q_{lift}) because it assumes tissues do not adhere to the surface. Partially adherent tissues require higher lift flow rates.

4.2.1.4 Diffusion of metabolites to the tissue

As there is no perfusion, the tissue can settle randomly at the bottom of the trap. Thus, as it is the worst-case scenario for metabolite diffusion, numerical diffusion simulations are done with the

sample in the middle (D_{O_2} in PDMS is greater than in water) and at the bottom (furthest from the channel) of the trap.

To model diffusive effects, except when specified, all walls are set with no-flux (Neumann) boundary conditions. All interface boundaries (Air/PDMS, PDMS/Medium and Medium/Tissue) are set with a continuity condition on metabolite concentration normalized by the saturation concentration in the material, and on diffusive flow through these interfaces. Boundaries that allow for medium to flow in and out (inlets and outlets) are set with a periodic boundary condition to account for the presence of other traps. The initial concentrations of metabolites are set to the experimental values (11 mM)¹⁰. Finally, the tissue consumes metabolite with a Michaelis-Menten kinetics³⁹,

$$q(c(\mathbf{x}, t)) = q_{max} \frac{c(\mathbf{x}, t)}{c(\mathbf{x}, t) + k_M} \quad (2)$$

where the values of the Michaelis-Menten constant (k_M) and the maximum uptake rate (q_{max}) are shown in Table 4-1.

4.2.1.4.1 Diffusion of continuously replenished metabolites

Continuously replenished metabolites (i.e. oxygen) are provisioned through all PDMS surfaces exposed to air. Setting a constant air concentration boundary condition on all these surfaces models the presence of continuously replenished metabolites. Setting a no-flux boundary condition on the surface right under the trap models the case where the device is bonded onto a glass slide. Although the maximum tissue diameter may not be reached within certain device geometries, the numerical value of the minimum oxygen concentration within the tissue gives an idea on the effect of device design on diffusion of continuously provisioned metabolites (Figure 4-4A and B).

4.2.1.4.2 Diffusion of finite metabolites

Finite metabolites, those that can be depleted in a medium (i.e. glucose), are strictly provisioned through the channel and require a medium change to be replenished. Running a time-dependent solver on a tissue consuming only the initially available nutrients in the medium models the diffusion of finite metabolites. The time-dependent solver is stopped when the minimum concentration of nutrients in the tissue reaches the Michaelis-Menten constant (k_M), the threshold commonly accepted under which concentration limits uptake kinetics³⁹. At that concentration, the

uptake rate of cells is reduced to half of that of cells with an abundance of nutrient (q_{max} with a zero order kinetic). The corresponding time is then plotted as a function of available medium volume per trap (V_M) per tissue volume (V_T) in Figure 4-4C.

4.2.2 Numerical models and results

In this section, the Finite Element Method is used to solve the numerical simulations defined previously to describe different properties of device operation and design. The results for tissue trapping, fluid mechanics and nutrient diffusion are presented and compared to expected analytical results when available.

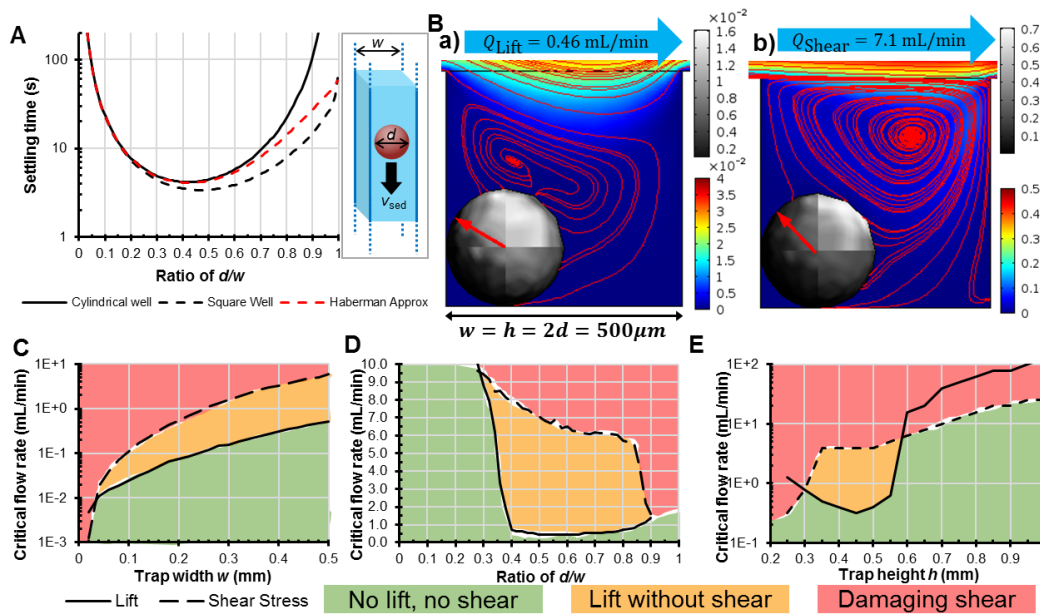


Figure 4-3: Hydrodynamic numerical results (A) Settling time as a function of the ratio of tissue diameter d over trap width w (as pictured in the inset) for two well cross-sections (cylindrical and square) compared to the analytical approximation by Haberman *et al*³². Settling distance over a height of w (cubic well) for tissues 2% heavier than water. (B) Streamlines (red lines), flow velocity colour map (mm/s) in the well around the tissue, and shear stress greyscale map (Pa) on the tissue with the net resulting force of the flow on the tissue (red arrow) for a flow rate generating tissue lift Q_{lift} (a) and generating damaging shear stresses Q_{shear} (b). Phase diagram representation of critical flow rates for tissue ejection Q_{lift} and tissue shearing Q_{shear} for (C) varying trap width (or device scale) with a constant ratio $d/w = 0.5$ and $w = h$ (result of ~5,800 simulations), (D) varying diameter over trap width ratios with $w = h = 0.5$ mm (result of ~4,300 simulations) and

(E) varying trap height with a constant ratio $d/w = 0.5$ and $w = 0.5$ mm (result of ~1250 simulations).

4.2.2.1 Sedimentation trapping

The case of a sphere settling in an infinitely long cylindrical reservoir of diameter w was solved analytically and approximated numerically with the following equation³² and is shown in Figure 4-3A as a function of d/w .

$$v_{set}(d/w) \approx \frac{1 - 0.76(d/w)^5}{1 - 2.1(d/w) + 2.1(d/w)^3 - 1.7(d/w)^5 + 0.73(d/w)^6} \cdot \frac{1}{18} \frac{\rho_T - \rho_M}{\eta} g_{eff} d^2 \quad (3)$$

The settling time of tissues in gravitational traps is derived by dividing the length over which a tissue settles (h) by the settling speed of equation (3) and constitutes an upper bound on the experimental sedimentation time in a cubic trap. Bottom wall effects⁴⁰ are neglected. The numerical results were derived for a settling length and trap size of $w = h = 500$ μ m. As settling slowdown due to sample confinement is only a function of d/w , the shape of the curve is not affected by the trap size. It will, however, increase or decrease settling times inversely proportionally to the change ($t \propto w^{-1}$). Decreasing the trap size by a factor of 10 will increase settling time by a factor of 10.

Figure 4-3A gives the complete information on settling times in gravitational traps. As expected, very small samples are exceedingly difficult to sediment due to their low weight and very large samples are exceedingly difficult to sediment due to increasing drag forces. This result shows that a square trap of a dimension between 1.4 and 3.3 times the tissue diameter ($0.3 < d/w < 0.7$) will minimize settling times. With this result, all further numerical simulations that do not require to vary tissue dimension are optimized with an average tissue to trap size ratio of $d/w = 0.5$.

4.2.2.2 Viable design and operating windows

Figure 4-3C through Figure 4-3E show the viable design and operating windows graphically. First, operating regions where tissues are subjected to damaging shear are highlighted in red. Second, optimal operating regions where tissues are removed from the device before being damaged are highlighted in orange. Third, operating regions where tissues remain in the device and aren't damaged by shear are highlighted in green. A proper device usage ensures that shear stresses never exceed critical values in the trap. Therefore, assuming a non-adherent surface, an optimal design guarantees the tissue is ejected from the trap before these shear stresses are reached.

4.2.2.2.1 Minimum trap size

MST devices should be designed so that critical shear stresses are never reached within operating conditions. In effect, this means that the critical flow required to shear and damage tissues (Q_{shear}) must be higher than the critical flow required to eject tissues from the device (Q_{lift}). However, as the device is scaled down to smaller dimensions, $Q_{shear} \propto w^3$ drops faster than $Q_{lift} \propto \sqrt{d}w^2$, as per equation (4). This means that there is a minimum trap width w_{min} under which tissues are potentially damaged by flow shear stress before being ejected from the device. Assuming a cubic trap with $h = w$ and a tissue to trap size ratio of $d/w = 0.5$, equation (5) describes this.

$$\left[Q_{shear} = \frac{\tau_{max}}{9.6 \eta} w^3 \right] > \left[Q_{lift} = \sqrt{d} w^2 \sqrt{\frac{4}{3} g \left(\frac{\rho_T}{\rho_M} - 1 \right)} \right] \quad (4)$$

$$w > w_{min} = 61 \frac{g \eta^2}{\tau_{max}^2} \left(\frac{\rho_T}{\rho_M} - 1 \right) \quad (5)$$

w_{min} is considered the minimum trap size under which shear stress reaches 1 Pa before the tissue is lifted and is 12 μm with Table 4-1. With a tissue to trap size ratio of $d/w = 0.5$, w_{min} can be simulated numerically by scaling the entire device down from the maximum tissue diameter of $d_{max} = 500 \mu\text{m}$. Finding the crossing point of the critical flow rate for lift and the critical flow rate for shear stress as a function of the well width w gives that minimum trap size.

Figure 4-3C shows the numerical results of the simulations where the Haberman approximation is bounded by the square and cylindrical well results. These results consider a tissue of 1.02 g/cm^3 density¹⁰ and are of the same order as the result in equation (5). A lighter or less compact tissue will result in a lower critical lift flow rate and minimum trap size. Conversely, a denser tissue will result in a higher minimum trap size. Although the results suggest to refrain from designing traps under the minimum trap size, if proper care is taken to limit flow in the device through external means, it is possible to make a device under the minimum trap size. The only drawback would be that tissues would not be extractable by applying flow and would require to dismantle the device or to design a separate extracting mechanism.

4.2.2.2.2 Tissue size variance

As all tissues are not exactly the same size, this section provides an analysis of tissue behaviour within the device for varying tissue dimensions. Similar to the previous section, ensuring that the device operates in a regime where damaging shear is impossible ($Q_{shear} > Q_{lift}$) will lead to a more

robust design. As the trapped tissue dimension changes within the device, the ease of shearing and ejecting it also changes.

Figure 4-3D highlights the design viability window in which the tissue is not subjected to damaging shear stresses but can still be ejected. Trapping tissues in too big ($w > d/0.3$) or too small ($w < d/0.9$) a device will lead to potentially damaging shear stresses before tissue ejection. This also shows that the $d/w = 0.5$ ratio proposed by settling times falls near the middle of this design viability window and it confirms that using it for numerical simulations does not lead to poor designs.

4.2.2.2.3 *Trap aspect ratio*

The shape and aspect ratio of the trap can also be tuned to fit specific applications. These simulations aim to study the effect of changing the well depth on the viability of tissues within a specific design. Figure 4-3E shows that increasing well height systematically impedes damaging shear stress. The reason for that can be seen from the colour mapping of Figure 4-3B: the magnitude of fluid velocity in the trap decreases exponentially with depth. As the trap is elongated (increasing height), tissues become exponentially harder to shear and eject. However, as the trap is shortened (reducing height), tissues are more affected by flow in the channel and are easier to shear and eject. Figure 4-3E also has an inversion around $h \approx 1.2w$ which shows that the optimal trap shape is a cube (or a trap with a height of similar scale to its cross-section).

4.2.2.3 **Optimal tissue metabolism**

The main purpose of MST devices is to provide miniaturized culture platforms for assays involving 3D tissue models. Therefore, replenishing the device medium periodically is necessary to sustain and maintain high viability of 3D tissue model samples. Modelling how nutrients are consumed and diffuse in and around the tissue leads to a better understanding of these replenishment times and ensures that device design affects tissue viability the least.

The numerical simulations aim to estimate how long tissues can remain trapped without replenishing the medium and without affecting cell metabolism. For this, we focus on characterizing two nutrients essential to cell metabolism found in most culture media: oxygen and glucose. Since a Michaelis-Menten uptake kinetics is considered per equation (2), we set the nutrient threshold concentration to affect cell metabolism as the Michaelis-Menten constant k_M .

Although there are complex mathematical models of cell proliferation and death⁴¹, this threshold on cell metabolism is a subset of such models that leads to conservative replenishment times.

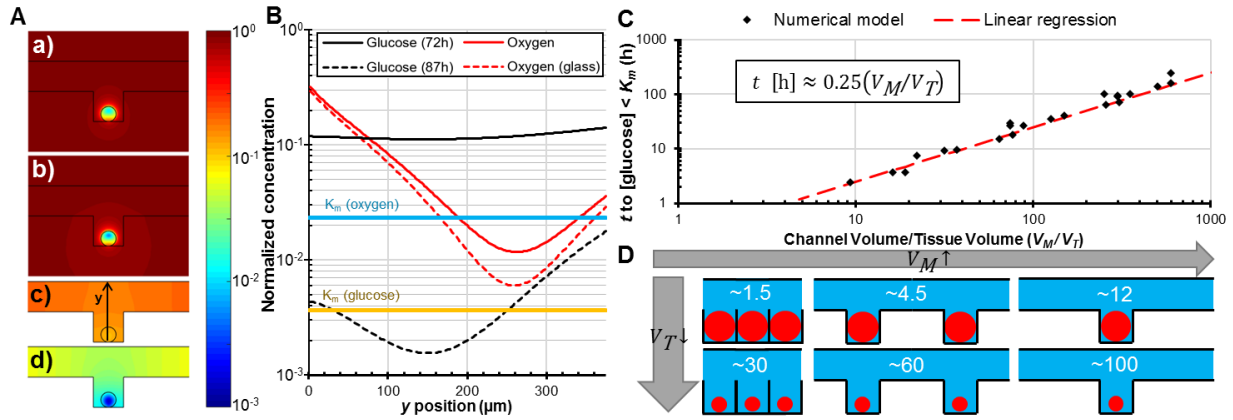


Figure 4-4: Spatial distribution of metabolites for $V_M/V_T \approx 300$, $d = 375 \mu\text{m}$ and $w = 750 \mu\text{m}$ (A) Colour mapping of the distribution of (a) oxygen in a full PDMS device, (b) oxygen in a PDMS device set on a glass slide, (c) glucose after 3 days, and (d) glucose after 87 hours; all normalized by the saturation concentration. (B) Distribution of various nutrients through the tissue and their associated Michaelis-Menten constants. (C) Time in hours before the minimum concentration of glucose in the tissue dips under the Michaelis-Menten constant, indicating a possibility in affecting cell metabolism as a function of the ratio of available volume per well on tissue volume (result of $\sim 4,000$ simulations). (D) Schematic of different available medium volume per well (V_M) on tissue volume (V_T) ratios

4.2.2.3.1 Metabolite spatial distribution

Figure 4-4A and Figure 4-4B respectively show the distribution of nutrients through the device in 2D and through the tissue in 1D. This provides insight on diffusion mechanism and on the actual position in the tissue where the minimum nutrient concentration is. For the purpose of this section, a slightly larger device has been chosen, with $d = 375 \mu\text{m}$ and $w = 750 \mu\text{m}$, to better see the effect of nutrient depletion and to demonstrate the worst-case scenario.

Figure 4-4A.a-b shows that the bottom of the tissue has more oxygen due to oxygen diffusing easier through PDMS than through water. However, oxygen distribution in PDMS is nearly halved in the case of a device with a glass bottom. The non-porous glass slides upon which users sometimes set their devices have a dramatic effect on oxygen supply to biological samples. If a device relies on

the porosity of the material used to supply oxygen, setting it on or bonding it to a glass slide is counter-intuitive.

The two-dimensional representation of nutrient distribution in Figure 4-4A.c-d shows that the bottom of the trap, or the side further from the channel, has less glucose. The shape of the trap does not affect much other than the position of the minimum nutrient concentration in the case of nutrients supplied exclusively through the channel medium as Figure 4-4B shows.

4.2.2.3.2 Medium replenishment window

Under a certain channel length L_{max} , channel shape does not significantly affect metabolite transport to the tissue. The nearly uniform glucose concentration of Figure 4-4A.c shows that diffusion occurs in similar or smaller timescales as nutrient uptake until glucose concentration reaches k_M as seen in Figure 4-4A.d. Figure 4-4C shows that increasing tissue volume hastens glucose consumption, reducing the time required to affect cell metabolism t . Similarly, increasing the available medium per tissue increases the available glucose, increasing the time required to affect metabolism t . The linear regression of Figure 4-4C follows the expected trend of equation (6) which was derived in previous work¹⁰ using the 1D simplification in Figure 4-2B.c inset for a regime that is not diffusion-limited.

$$t = a \frac{c_0}{q_{max}\rho_{cell}} \frac{V_M}{V_T} + b \quad (6)$$

Where c_0 is the initial metabolite concentration, V_M is the available medium volume per tissue, V_T is the volume of consuming tissue, $q_{max}\rho_{cell}$ is the maximum metabolite uptake in mol/m³s as shown in Table 4-1, and a and b are lumped proportionality constants that account for design geometry. For equation (6) to be valid, the longest dimension of the channel needs to be small enough (equation (7)) to stay out of a diffusion-limited regime. This is derived from a zero order Damköhler number $Da_0 = t_{diff}/t_{up}$ using the total nutrient uptake time $t_{up} = c_0 V_M / q_{max}\rho_{cell} V_T$ and the total nutrient diffusion time $t_{diff} = L^2 / 8D_M$ where $Da_0 < 1$ to remain out of a diffusion-limited regime. With a target $V_M/V_T = 100$ (or $t = 24$ h), the threshold value L_{max} is approximated to 6.41 mm with the parameters of Table 4-1.

$$L < L_{max} = \sqrt{8 \frac{c_0 D_M}{q_{max}\rho_{cell}} \frac{V_M}{V_T}} \quad (7)$$

To use Figure 4-4C, the desired maximum replenishment time and maximum tissue volume are required; in other words, the experimental frequency of medium replenishment and the largest trapped tissue samples. With the figure, medium replenishment time gives the target V_M/V_T ratio and the largest expected V_T returns the required medium volume. Figure 4-4D shows different V_M/V_T ratios for different trap densities and tissue sizes. In practice, two things must be considered: (1) as Figure 4-4B shows, the region where metabolite concentration starts to affect metabolism is a small fraction of the tissue and (2) metabolite change takes some time to actually affect cell viability. This results in a practical wait time that can be significantly longer than the time in Figure 4-4C without affecting tissue viability.

4.2.3 Discussion

The previous numerical results provide a thorough example of how MSTs can be optimally designed and operated. This section compiles these results and summarizes the proposed design constraints of sample traps depending on the known sample characteristics. Table 4-2 summarizes the main design parameters as enumerated in the method section and shown in Figure 4-2B.

Device operation		Design dimension ranges	Optimal dimension
Minimum settling time when:		$1.2d < w < 6.7d$	$w \approx 2d$
Sample ejection prior to reaching $\tau > 1$ Pa	Minimum trap width	$w > 30 \mu\text{m}$	Any
	Trap width	$1.1d < w < 3.3d$	$w \approx 2d$
	Trap aspect ratio	$0.6w < h < 1.1w$	$h \approx 0.9w$
Maximum one sample per trap when:		$w \leq 1.4d$	$w \approx 1.4d$
Maximum tissue proliferation (24 h) when:		$V_M \geq 100V_T$	$V_M \approx 100V_T$

Table 4-2: Device width w and height h compared to tissue diameter d to optimize device operation

We conclude that the optimal dimensions of a trap are a base of $2d \times 2d$ and a height slightly lower than $2d$; in other words, a cube of side $2d$. Although these dimensions are around $2d \approx w \approx h$, this would potentially allow several tissues to be trapped within the same trap unless manually loaded. To ensure that only a single sample is allowed per cubic trap, the dimensions of the trap need to be slightly smaller ($w \leq 1.4d$) than what is recommended in Table 4-2. Also, Figure 4-3E shows that making a trap shallower or deeper than $0.9w$ reduces the operating window in which tissues are ejected before being sheared. This leads to a higher minimum trap size and more stringent operating windows for tissues of varying dimensions when $h \neq 0.9w$ compared to Figure 4-3C and D respectively. Additionally, if the trap is too elongated, it will allow multiple samples

to be trapped on top of each other regardless of trap dimensions, thus requiring user input to ensure single sample trapping. Opting for cubic or shallower traps solves this issue. Finally, since flow recirculation affects samples higher in the trap more strongly than samples at the bottom, it is possible to design traps that theoretically allow several samples but still trap single samples.

With a d/w ratio of 0.5 and $d = 250 \mu\text{m}$ set at half the maximum tissue diameter, Table 4-3 emphasizes which aspects of device operation are affected by sample density. For the case of ejection flow rates, the supplementary video online concords with expected flow rate values (re-evaluated precisely for the experiment and available in the video caption).

The effect of tissue density on device operation is function of the effective density, or tissue density minus medium density $\rho_{\text{tissue}} - \rho_{\text{medium}}$. The only operating aspects that are affected by density require sample movement. Settling wait times and ejection flow rates are directly affected, whereas the minimum device dimension is affected due to that value being a crossing point between a Q_{lift} and a Q_{shear} curve. Finally, damaging shear stresses are not affected by tissue density. If tissues are too heavy (e.g. 2 g/cm^3), it is possible to reach regimes where damaging shear stress occurs at lower flow rates than lift regardless of design. However, such high density cells or tissues do not exist: for example, single HeLa cells were found to have a density of $\sim 1.043 \text{ g/cm}^3$ ⁴².

Volumetric mass density (g/cm^3)	1.01	1.1	2
Settling wait times (s)	≈ 10	≈ 1	≈ 0.1
Minimum device dimension (μm)	≈ 10	≈ 100	$\approx 1\,000$
Ejection flow rates (mL/min)	≈ 0.1	≈ 1	≈ 10
Shearing flow rates (mL/min)	≈ 7		

Table 4-3: Comparing device design and operation for specific tissue densities

Ultimately, accurately defining cell life and death or viability within a mathematical model is a challenging problem that has yet to be validated experimentally. Thus, this study focuses on establishing the time before cell metabolism or proliferation is expected to be affected. With Michaelis-Menten kinetics, this is associated with a reduction of cellular uptake of nutrients to half of the maximum value, or a nutrient concentration equal to the Michaelis-Menten constant. The time derived from the simulations and plotted in Figure 4-4C helps establish a conservative replenishment time t_{rep} . Following these recommendations ensures that cells throughout the tissue have an excess of nutrients at all times without perfusion by renewing cell medium at the interval dictated by t_{rep} . In practice and since there is a certain time before cells react to nutrient change, it

is possible to leave tissues longer than the suggested time in this work without significantly affecting cell viability.

To validate theoretical replenishment times t_{rep} , the experimental methodology of several publications was investigated and compared with the model results. Table 4-4 compares the experimental t_{rep} to the modelled t_{rep} for various MST designs and tissue sizes. MST designs all fall within the few trapping mechanisms enumerated in Figure 4-1. Tissue size varies from single cells to large tissue models.

Trapping mechanisms	Reference	Diameter of sample (μm)	$\frac{V_M}{V_T}$	t_{rep} (h)	
				Exp.	Model
Resistive	Frimat et al. ¹¹	17.9*	112	Perfusion	28
	Kukhtevich et al. ¹⁴	20*	127	Perfusion	31
	Occhetta et al. ¹⁵	16*	729	Perfusion	180
	Das et al. ^{53,§}	250 [†]	138	24	34
Inertial	Ota et al. ¹⁸	450 [†]	168	Perfusion	41
Sedimentation	Astolfi et al. ^{10,§}	380 [‡]	208	48	52
	Anada et al. ⁷	600 [†]	52	24	13
		310 [†]	376	48	93
	Patra et al. ⁹	130 [†]	53	12	13
	Patra et al. ^{54,§}	225 [†]	92	24	23
Open microfluidics	Frey et al. ²²	400 [†]	470	Perfusion	116
	Marimuthu et al. ^{23,§}	500 [†]	378	24	92
	Grimes et al. ⁵⁰	585 [†]	79	24	20
	Torisawa et al. ⁵⁵	260 [†]	165	48	41

* Single cells, [†] Spheroids, [‡] Micro-dissected tissue, [§] our group

Table 4-4: Comparing experimental and model replenishment times t_{rep} for several publications

Out of the 13 reviewed publications we found that 5 employed perfusion, thus automatically satisfying the modelled t_{rep} and ensuring optimal tissue metabolism; 4 had experimental t_{rep} under the modelled t_{rep} , ensuring optimal tissue metabolism; 3 had experimental t_{rep} within 20% of the modelled t_{rep} , causing glucose concentrations to briefly dip under k_M but not causing significant glucose deprivation; one had an experimental t_{rep} nearly twice the modelled t_{rep} , affecting tissue growth rate. The latter is the only publication with under-replenished tissues (highlighted in Table 4-4) and reports an increase in tissue growth rate when replenishment time is reduced from 48 to 24 hours and noticeably decreases as tissue size increases with the same replenishment time. The lack of under-replenished tissues in the literature is not surprising as tissue growth, and ultimately viability, should be affected in this case; biological results of under-replenished experimental

methodology would then be less appealing for publication. Finally, Table 4-4 shows that perfusion is not necessary in several cases; some permitting replenishment times of over 96 hours (4 days). These cases would benefit from using replenishment methods over bulky, contamination-prone perfusion systems.

4.2.4 Conclusion

The previous analytical and numerical models have shown that optimizing tissue viability *in vitro* is possible and necessary to design effective MSTs. This article presents a complete and systematic analysis of all critical design variables of MSTs: trap size, tissue size, trap height and available medium per trap. Before culturing and analysing 3D tissue models in MSTs, ensuring that the device follows the specific design rules established in this research will confirm whether or not device design may affect the viability of samples.

When considering sedimentation, trapping stability and shear stress, the design rules in Table 4-2 prescribe that the best possible practical design is cubic traps at most twice the tissue diameter. When considering bonding to or using glass slides, the results show that they significantly impair oxygen transport and may lead larger tissues to anoxia. Finally, when considering nutrients that are only supplied through the medium, having a medium volume per trap that is at least 100 times the tissue volume with a maximum channel length of 6.4 mm ensures maximum metabolism (0th order kinetics) for at least 24 hours. These V_M/V_T ratio and maximum channel length can be tuned to the required channel design and desired replenishment times with equations (6) and (7). All of the results are derived for tissues with parameters listed in Table 4-1.

The prescribed design rules cover a wide range of devices made of porous materials (e.g. PDMS) with designs reducible to the simple MST geometry. These rules are consistent with published experimental studies utilizing MSTs. In some cases, perfusion is used where it would not be necessary^{11,14,15}. In other cases, it is possible to have a slight reduction of viability when a suboptimal V_M/V_T ratio is chosen^{7,10}. Ultimately, designs that aim to trap single cells or tissues should use nearly cubic traps at most twice the tissue size regardless of the material used for fabrication. In the case that the trap is larger, special mechanisms are put in place to ensure a single tissue per trap¹⁵.

The results presented in this article circumscribe a very specific but extensive set of experiments that will add to a better understanding of tissue viability *in vitro*. Validating these models requires precise knowledge of cell parameters: tissue density, cell density, Michaelis-Menten constants, uptake rate and tissue dimensions. These parameters can be evaluated experimentally for specific cell types with specialized equipment. The preceding design rules will enable designing MSTs as close as possible to optimal operating conditions, thus fabricating devices that fully exploit the potential of microfluidics to stably trap-release, and precisely control the *in vitro* tissue microenvironment.

4.2.5 References

1. Fennema, E., Rivron, N., Rouwkema, J., van Blitterswijk, C. & de Boer, J. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends Biotechnol.* **31**, 108–115 (2013).
2. Ghaemmaghami, A. M., Hancock, M. J., Harrington, H., Kaji, H. & Khademhosseini, A. Biomimetic tissues on a chip for drug discovery. *Drug Discov. Today* **17**, 173–181 (2012).
3. Young, E. W. K. Cells, tissues, and organs on chips: challenges and opportunities for the cancer tumor microenvironment. *Integr. Biol.* **5**, 1096–1109 (2013).
4. Porto, D. A., Rouse, T. M., San-Miguel, A. & Lu, H. in *Microfluidic Methods for Molecular Biology* 1–18 (Springer International Publishing, 2016). doi:10.1007/978-3-319-30019-1_1
5. Lindstrom, S. & Andersson-Svahn, H. Overview of single-cell analyses: microdevices and applications. *Lab Chip* **10**, 3363–3372 (2010).
6. Whitesides, G. M. The origins and the future of microfluidics. *Nature* **442**, 368–373 (2006).
7. Anada, T., Fukuda, J., Sai, Y. & Suzuki, O. An oxygen-permeable spheroid culture system for the prevention of central hypoxia and necrosis of spheroids. *Biomaterials* **33**, 8430–8441 (2012).
8. Khabiry, M. *et al.* Cell docking in double grooves in a microfluidic channel. *Small* **5**, 1186–1194 (2009).
9. Patra, B., Peng, C.-C., Liao, W.-H., Lee, C.-H. & Tung, Y.-C. Drug testing and flow cytometry analysis on a large number of uniform sized tumor spheroids using a microfluidic device. *Sci. Rep.* **6**, 21061 (2016).
10. Astolfi, M. *et al.* Micro-dissected tumor tissues on chip: an ex vivo method for drug testing and personalized therapy. *Lab Chip* **16**, 312–325 (2016).
11. Frimat, J.-P. *et al.* A microfluidic array with cellular valving for single cell co-culture. *Lab Chip* **11**, 231–237 (2011).
12. Lee, J. & Burns, M. A. Asymmetric traps array for particle transport. *RSC Adv.* **5**, 3358–3364 (2015).
13. Chung, K. *et al.* A microfluidic array for large-scale ordering and orientation of embryos.

- Nat. Methods* **8**, 171–176 (2011).
14. Kukhtevich, I. V., Belousov, K. I., Bukatin, A. S., Dubina, M. V. & Evstrapov, A. A. A microfluidic chip with hydrodynamic traps for in vitro microscopic investigations of single cells. *Tech. Phys. Lett.* **41**, 255–258 (2015).
 15. Occhetta, P., Licini, M., Redaelli, A. & Rasponi, M. Design of a microfluidic strategy for trapping and screening single cells. *Med. Eng. Phys.* **0**, 1–8 (2015).
 16. Grist, S. M., Nasser, S. S., Poon, T., Roskelley, C. & Cheung, K. C. On-chip clearing of arrays of 3-D cell cultures and micro-tissues. *Biomicrofluidics* **10**, 44107 (2016).
 17. Karimi, A., Yazdi, S. & Ardekani, A. M. Hydrodynamic mechanisms of cell and particle trapping in microfluidics. *Biomicrofluidics* **7**, (2013).
 18. Ota, H. *et al.* Three-dimensional spheroid-forming lab-on-a-chip using micro-rotational flow. *Sensors Actuators, B Chem.* **147**, 359–365 (2010).
 19. Lee, M. G., Shin, J. H., Bae, C. Y., Choi, S. & Park, J.-K. Label-Free Cancer Cell Separation from Human Whole Blood Using Inertial Microfluidics at Low Shear Stress. *Anal. Chem.* **85**, 6213–6218 (2013).
 20. Ameri, S. K., Singh, P. K. & Sonkusale, S. Utilization of graphene electrode in transparent microwell arrays for high throughput cell trapping and lysis. *Biosens. Bioelectron.* **61**, 625–630 (2014).
 21. Bocchi, M. *et al.* Inverted open microwells for cell trapping, cell aggregate formation and parallel recovery of live cells. *Lab Chip* **12**, 3168 (2012).
 22. Frey, O., Misun, P. M., Fluri, D. a, Hengstler, J. G. & Hierlemann, A. Reconfigurable microfluidic hanging drop network for multi-tissue interaction and analysis. *Nat. Commun.* **5**, 4250 (2014).
 23. Marimuthu, M. *et al.* Single Inlet Multi-Size Spheroid Synthesis Chip (SIMSS Chip). in *MicroTAS 2015* 3 (2015).
 24. Leclerc, E., Sakai, Y. & Fujii, T. Cell Culture in 3-Dimensional Microfluidic Structure of PDMS (polydimethylsiloxane). *Biomed. Microdevices* **5**, 109–114 (2003).
 25. Tan, G.-D. S. *et al.* A thin-walled polydimethylsiloxane bioreactor for high-density hepatocyte sandwich culture. *Biotechnol. Bioeng.* **110**, 1663–1673 (2013).
 26. St-Georges-Robillard, A. *et al.* Spectroscopic imaging system for high-throughput viability assessment of ovarian spheroids or microdissected tumor tissues (MDTs) in a microfluidic chip. in *Photonic Therapeutics and Diagnostics XII* **9689**, 96894E1-5 (2016).
 27. Markov, D. a, Lillie, E. M., Garbett, S. P. & McCawley, L. J. Variation in diffusion of gases through PDMS due to plasma surface treatment and storage conditions. *Biomed. Microdevices* **16**, 91–6 (2014).
 28. Shiku, H. *et al.* Oxygen Permeability of Surface-modified Poly(dimethylsiloxane) Characterized by Scanning Electrochemical Microscopy. *Chem. Lett.* **35**, 234–235 (2006).
 29. Kim, M.-C., Lam, R. H. W., Thorsen, T. & Asada, H. H. Mathematical analysis of oxygen transfer through polydimethylsiloxane membrane between double layers of cell culture channel and gas chamber in microfluidic oxygenator. *Microfluid. Nanofluidics* **15**, 285–296

- (2013).
30. Han, P. & Bartels, D. M. Temperature Dependence of Oxygen Diffusion in H₂O and D₂O. *J. Phys. Chem.* **100**, 5597–5602 (1996).
 31. Francis, A. W. Wall Effect in Falling Ball Method for Viscosity. *Physics (College. Park. Md)*. **4**, 403 (1933).
 32. Haberman, W. L. & Sayre, R. M. Motion of rigid and fluid spheres in stationary and moving liquids inside cylindrical tubes. *David Taylor Model Basin Report, Washingt. D. C., U. S. Navy Dept.* (1958).
 33. Song, J. W. *et al.* Computer-Controlled Microcirculatory Support System for Endothelial Cell Culture and Shearing. *Anal. Chem.* **77**, 3993–3999 (2005).
 34. Chisti, Y. Hydrodynamic Damage to Animal Cells. *Crit. Rev. Biotechnol.* **21**, 67–110 (2001).
 35. Di Carlo, D., Wu, L. Y. & Lee, L. P. Dynamic single cell culture array. *Lab Chip* **6**, 1445 (2006).
 36. Rizvi, I. *et al.* Flow induces epithelial-mesenchymal transition, cellular heterogeneity and biomarker modulation in 3D ovarian cancer nodules. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, E1974–E1983 (2013).
 37. Al-Rubeai, M., Singh, R. P., Goldman, M. H. & Emery, A. N. Death mechanisms of animal cells in conditions of intensive agitation. *Biotechnol. Bioeng.* **45**, 463–472 (1995).
 38. Akimoto, S., Mitsumata, M., Sasaguri, T. & Yoshida, Y. Laminar Shear Stress Inhibits Vascular Endothelial Cell Proliferation by Inducing Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p21Sdi1/Cip1/Waf1. *Circ. Res.* **86**, 185–190 (2000).
 39. Johnson, K. a. & Goody, R. S. The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis–Menten Paper. *Biochemistry* **50**, 8264–8269 (2011).
 40. Happel, J. & Brenner, H. in 286–357 (Springer Netherlands, 1983). doi:10.1007/978-94-009-8352-6_7
 41. Venkatasubramanian, R., Henson, M. a. & Forbes, N. S. Integrating cell-cycle progression, drug penetration and energy metabolism to identify improved cancer therapeutic strategies. *J. Theor. Biol.* **253**, 98–117 (2008).
 42. Wolff, D. A. & Pertoft, H. Separation of HeLa cells by colloidal silica density gradient centrifugation. I. Separation and partial synchrony of mitotic cells. *J. Cell Biol.* **55**, 579–85 (1972).
 43. Bertuzzi, A., Fasano, A., Gandolfi, A. & Sinisgalli, C. Necrotic core in EMT6/Ro tumour spheroids: Is it caused by an ATP deficit? *J. Theor. Biol.* **262**, 142–150 (2010).
 44. Freyer, J. P. & Sutherland, R. M. A reduction in the in situ rates of oxygen and glucose consumption of cells in EMT6/Ro spheroids during growth. *J. Cell. Physiol.* **124**, 516–524 (1985).
 45. Rikmenspoel, R. & Caputo, R. The Michaelis-Menten constant for fructose and for glucose of hexokinase in bull spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* **12**, 437–444 (1966).

46. Casciari, J. J., Sotirchos, S. V & Sutherland, R. M. Variations in tumor cell growth rates and metabolism with oxygen concentration, glucose concentration, and extracellular pH. *J. Cell. Physiol.* **151**, 386–94 (1992).
47. Wagner, B. a, Venkataraman, S. & Buettner, G. R. The rate of oxygen utilization by cells. *Free Radic. Biol. Med.* **51**, 700–712 (2011).
48. Ochs, C. J., Kasuya, J., Pavesi, A. & Kamm, R. D. Oxygen levels in thermoplastic microfluidic devices during cell culture. *Lab Chip* **14**, 459–62 (2014).
49. Radisic, M. *et al.* Oxygen gradients correlate with cell density and cell viability in engineered cardiac tissue. *Biotechnol. Bioeng.* **93**, 332–343 (2006).
50. Grimes, D. R., Kelly, C., Bloch, K. & Partridge, M. A method for estimating the oxygen consumption rate in multicellular tumour spheroids. *J. R. Soc. Interface* **11**, 20131124–20131124 (2014).
51. MacDougall, J. D. & McCabe, M. Diffusion coefficient of oxygen through tissues. *Nature* **215**, 1173–1174 (1967).
52. Sumaru, K., Sugiura, S. & Kanamori, T. Optimal design of cell culture chip on the basis of oxygen and glucose supply to cultivated cells in the chip. *Biochem. Eng. J.* **36**, 304–309 (2007).
53. Das, T. *et al.* Empirical chemosensitivity testing in a spheroid model of ovarian cancer using a microfluidics-based multiplex platform. *Biomicrofluidics* **7**, 11805 (2013).
54. Patra, B. *et al.* Are 3D spheroids always more resistant to chemotherapy than 2D cultures? A chip-based survey using ovarian cancer cell lines. in *MicroTAS 2016* 1555–1556 (2016).
55. Torisawa, Y. *et al.* A multicellular spheroid array to realize spheroid formation, culture, and viability assay on a chip. *Biomaterials* **28**, 559–566 (2007).

4.2.6 Acknowledgements

We thank Dr. Anne-Marie Mes-Masson and her team for their help in guiding the applicability of this work. We also acknowledge Amélie St-Georges Robillard for her assistance in proof-reading the manuscript. N.R. acknowledges funding from the Quebec Fund for Research in Nature and Technology (185159). T.G. acknowledges funding from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (RGPIN2014-06409).

4.2.7 Author Contributions

N.R. and T.G. designed the study, analysed the results and wrote the manuscript, N.R. and F.M. produced the numerical results of simulations. All authors reviewed the manuscript.

4.2.8 Additional information

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

CHAPITRE 5 DISCUSSION GÉNÉRALE

Ce chapitre établit des liens entre les chapitres précédents afin d'analyser les résultats de ce projet de maîtrise en leur globalité. L'objectif de ce mémoire étant d'analyser l'opération de pièges microfluidiques à échantillon, ce chapitre fait une revue générale des règles découlant des analyses présentées. Les règles sont tout d'abord résumées dans un format compact. Elles sont appliquées à des dispositifs rapportés dans la littérature lorsque possible. La compatibilité des différentes règles est discutée et les conséquences des incompatibilités sont présentées. Enfin, les limites de la méthodologie de simulation permettent d'évaluer la pertinence des résultats.

5.1 Synthèse des règles de conception

Les règles de conception développées grâce aux résultats présentés aux chapitres précédents sont résumées dans cette section. Ces règles de conception, tirées principalement de modèles analytiques et de résultats de simulations numériques, sont séparées en trois catégories : (1) les règles pour le remplissage de pièges microfluidiques à échantillon à gouttelettes; (2) les règles pour le design de dispositif et leur opération avec un débit; (3) les règles pour le temps d'échange du milieu. Ces règles sont comparées à des dispositifs publiés dans la littérature lorsque les résultats requis (débits maximums, dimensions, volumes, temps d'échange, etc.) y sont publiés.

5.1.1 Règles pour le remplissage de dispositifs

Les règles concernant le remplissage, l'opération et les effets capillaires dans des PMÉ à gouttelettes sont résumées ici. La condition principale de la conception de dispositifs qui exploitent des effets capillaires est d'éviter les fuites pendant leur utilisation. La taille maximale théorique d'un orifice pouvant supporter une gouttelette statique est donnée par la longueur capillaire qui est de 5.4 mm pour de l'eau. À cette taille, la gouttelette est très instable et peut tomber à la moindre vibration. C'est pour cela que les dispositifs conçus pour générer des gouttelettes restent en deçà de 4 mm pour assurer leur stabilité.

Les dispositifs qui exploitent des gouttelettes suspendues pour former des sphéroïdes et cultiver des tissus sont nouveaux et il n'existe que peu de variantes [5], [92]. Les caractéristiques des gouttelettes formées dans plusieurs dispositifs sont comparées au Tableau 5-1. Certains d'entre

eux n'exploitent pas la configuration typique de piège microfluidique à échantillon telle que présentée à la Figure 1-3, mais utilisent tout de même des gouttelettes [93]–[95].

Tableau 5-1 : Opération de dispositifs à gouttelettes

		Goutte	Opération	
		Diamètre	Débit	Pression
Ref.	PMÉ	mm	mL/min	mm H ₂ O
[94]	Non	~2.7	-	-
[95]	Non	~3.4	-	-
[93]	Non	3.0	-	4.0
[27]	Oui	3.5	< 0.6	8.5
[26]	Oui	0.75	~7.0	25

Si un débit ou une pression est imposé dans une gouttelette (soit par une pompe à débit/pression, ou par une pression hydrostatique), sa taille maximale possible est amoindrie. Comme le tableau précédent le montre, les dispositifs à gouttelettes publiés jusqu'à présent n'exploitent que rarement une configuration typique de PMÉ. Un article de revue qui compare les techniques pour synthétiser des sphéroïdes affirme que la technique de gouttelettes est instable, nécessite beaucoup de main-d'œuvre et ne permet pas la production de masse [5]. Cependant, comme le démontrent les résultats avec des configurations en PMÉ publiées depuis [26], [27], l'affirmation de l'article de revue ne considère pas des gouttelettes suffisamment petites.

Pour éviter qu'un dispositif à gouttelettes fuie et pour augmenter sa fiabilité et la reproductibilité des résultats, il faut chercher un compromis entre la taille des gouttelettes et la facilité d'opération du dispositif. De grosses gouttelettes (~2 à 4 mm) sont moins stables [96] et ne permettent pas d'opérer un dispositif avec des débits et pressions externes, mais permettent de générer des sphéroïdes plus gros (> 700 µm) [93]. Inversement, de petites gouttelettes (< 1 mm) sont plus robustes et permettent un débit et une pression d'opération (voir équation (2-15)), mais limitent la taille maximale des sphéroïdes générés (~500 µm) [26]. Puisque cette taille maximale est similaire au diamètre maximum défini aux sections 3.2.1 et 4.2.1.1, il est recommandé d'opter pour **des gouttelettes en deçà du millimètre** dans des PMÉ à gouttelettes.

5.1.2 Règles pour le design et le débit appliqué

En plus de considérer les conditions de formation de gouttelettes pour des PMÉ à gouttelettes, il faut suivre des conditions de conception pour la forme du piège lui-même. Pour les

débits critiques et la conception de PMÉ, les résultats sont présentés dans l'article du Chapitre 4. La condition principale d'une conception éclairée de PMÉ est d'empêcher les tissus piégés d'être endommagés par des contraintes de cisaillement excédant τ_{max} causées par des débits trop élevés Q_{shear} . Une option est d'empêcher l'atteinte de ces débits critiques par un contrôle externe tel que l'ajout d'une limite de débit sur la pompe ou des valves qui réguleraient le débit. Une option plus simple est de suivre des règles de conception qui font en sorte que les tissus piégés soient éjectés du dispositif Q_{lift} avant de subir des contraintes de cisaillement trop élevées $Q_{lift} < Q_{shear}$. Ces règles de conception, résumées au tableau de l'article (Table 4-2) dictent la forme du piège qui permet d'assurer la viabilité de tissus soumis à des débits. Dans le cas d'un PMÉ type tel que présenté à la Figure 1-3, les dimensions du piège doivent être un prisme à base carrée de côté w de hauteur h un peu plus creuse que w et de côté w au plus deux fois plus gros que le tissu à piéger (de diamètre d). Le côté w doit aussi être plus grand qu'une valeur w_{min} qui dépend des paramètres de l'échantillon piégé (Table 4-2).

$$\begin{aligned} 1,2d < w < 1,4d \\ 0,6w < h < 1,1w \end{aligned} \tag{5-1}$$

En respectant ces dimensions, un tissu piégé sera forcément éjecté avant d'être endommagé par un débit trop élevé dont la valeur même dépend des paramètres du tissu. Ces débits critiques ne peuvent être évalués précisément qu'avec la densité volumique de masse et la résistance au cisaillement du type de tissu piégé. La dépendance aux paramètres du tissu est établie au tableau de l'article (Table 4-3).

$$\begin{aligned} Q_{lift}, w_{min} &\propto (\rho_T - \rho_M) \\ t_{piégeage} &\propto (\rho_T - \rho_M)^{-1} \\ Q_{shear} &\propto \tau_{max} \end{aligned} \tag{5-2}$$

En résumé, un tissu de densité volumique de masse ρ_T relative au milieu ρ_M plus élevé augmente linéairement le débit critique d'éjection Q_{lift} et la dimension minimum du côté w_{min} et diminue le temps de piégeage $t_{piégeage}$. Enfin, un tissu qui a une plus grande résistance au cisaillement τ_{max} augmente le débit critique d'endommagement Q_{shear} .

5.1.3 Règles pour le temps d'échange du milieu

Une fois le tissu piégé et protégé des débits trop élevés, il consomme les nutriments qui lui sont fournis. Le temps nécessaire à la déplétion t_{dep} de ces nutriments dépend de la cinétique de réaction qui régit la consommation des nutriments telle que définie à l'équation (3-17). L'analyse effectuée à la section 3.2.2 considère une cinétique d'ordre zéro tandis que l'étude numérique effectuée dans l'article à la section 4.2.2.3.2 considère une cinétique de Michaelis-Menten. Cette dernière émule mieux le métabolisme réel qui se traduit en des temps de déplétion t_{dep} prédits plus élevés et plus réalistes qu'avec une cinétique d'ordre zéro.

Les résultats prédits dans l'article du Chapitre 4 et la régression linéaire de la Figure 4-4 permettent d'établir un paramètre de comparaison pour évaluer les designs de PMÉ publiés par d'autres chercheurs (compilés à la Figure 1-2). Les paramètres à considérer sont le volume de tissu présent dans le dispositif V_T et le volume de milieu V_M associé. Certains dispositifs piègent plusieurs tissus, allant de 1 à 5000 tissus par dispositif. Le temps expérimental de recharge du milieu (lorsqu'il est rapporté dans les articles de PMÉ) est alors comparé au temps suggéré par l'article du Chapitre 4.

Tableau 5-2 : Comparaison du temps théorique d'échange du milieu suggéré par les simulations (Temps théo. t_{dep}) au temps expérimental rapporté dans certains articles (Temps exp.)

Description du PMÉ	Ref.	# de tissus	Diamètre des tissus	V_T	V_M	$\frac{V_M}{V_T}$	Temps exp.	Temps théo. t_{dep}
		—	µm	µL	µL	—	h	h
Serpentins résistifs	[11]	25	17,9	$7,51 \times 10^{-5}$	0,0084	112	Perfusion	28
Serpentins résistifs	[13]	700	500	$4,58 \times 10^1$	—	—	—	—
Coupoles résistives	[14]	9	20	$3,77 \times 10^{-5}$	0,0048	127	Perfusion	31
Réservoir résistif	[15]	1	16	$2,14 \times 10^{-6}$	0,0016	729	Perfusion	180
Cylindre inertiel	[18]	1	450	$4,77 \times 10^{-2}$	8	168	Perfusion	41
Cube gravitationnel	[22]	1	380	$2,87 \times 10^{-2}$	3.78	132	48	33
Demi-sphères gravitationnelles	[23]	512	600	$5,79 \times 10^1$	3000	52	24	13
		512	310	7,99	3000	376	48	93
Cubes gravitationnels	[25]	5000	130	5,82	306	53	12	13
Gouttelettes	[27]	1	400	$3,35 \times 10^{-2}$	158	470	Perfusion	116
Gouttelettes	[26]	1	500	$6,54 \times 10^{-2}$	6	92	24	23
Plaque microtitre	[97]	24	585	2,52	200	79	24	20

Le Tableau 5-2 présente plusieurs situations par rapport à l'utilisation de PMÉ dans la littérature. (1) Certains expérimentateurs optent pour des dispositifs réapprovisionnés par perfusion constante même si ce n'est pas nécessaire pour assurer la viabilité des échantillons (temps expérimental noté « Perfusion » et temps de déplétion t_{dep} plus grand que quelques jours). (2) Certains optent pour des dispositifs non perfusés, mais ne changent pas le milieu assez fréquemment pour assurer un métabolisme maximum à travers l'expérience (temps expérimental plus élevé que le temps théorique). (3) Certains optent pour des dispositifs non-perfusés et changent le milieu à des fréquences recommandées par t_{dep} (temps expérimental plus faible que le temps théorique). (4) Une situation qui n'est pas présente dans la littérature est un dispositif perfusé avec raison (temps expérimental noté « Perfusion » et temps de déplétion en deçà d'un jour).

Afin de créer des dispositifs de mise en culture de modèles tissulaires 3D, l'important est d'avoir un environnement reproduisant le mieux les conditions *in vivo* [53]. Des conditions de perfusion constante de nutriments ou de déplétion excessive de nutriments ne permettent pas d'atteindre cet objectif. Imiter l'apport cyclique de nutriments soit en perfusant des concentrations qui varient ou en échangeant le milieu périodiquement (t_{dep}) permet d'atteindre cet objectif.

5.2 Remplissage et opération de PMÉ à gouttelettes

Dans le cas de PMÉ à gouttelettes, en plus du débit de fuite, il faut considérer les débits de cisaillement et d'éjection. Selon le Tableau 5-1, les débits de remplissage des dispositifs qui existent ne dépassent pas ~ 7 mL/min pour 8 pièges en série ($N = 8$). Le débit maximum Q_{max} en fonction du nombre de pièges en série N peut être retrouvé analytiquement avec l'équation (2-15) et est maximisé dans une analyse pire cas avec les dimensions tirées du dispositif de Marimuthu et al. : L typique d'une plaque microtitre à 96 puits (9 mm), un rayon hydraulique du microcanal $r_{h-c} = 667 \mu\text{m}$ et de la gouttelette $r_{h-g} = 375 \mu\text{m}$.

Pour ce qui est des débits d'éjection et de cisaillement, ils sont indépendants de N et peuvent être retrouvés avec la même méthodologie utilisée pour produire les résultats de la Figure 4-3D. Dans le cas d'un tissu sphérique piégé dans une gouttelette avec les dimensions décrites plus haut, les simulations numériques donnent un débit d'éjection minimum de $Q_{lift} \approx 4,7$ mL/min et un débit critique de cisaillement minimum de $Q_{shear} \approx 45$ mL/min.

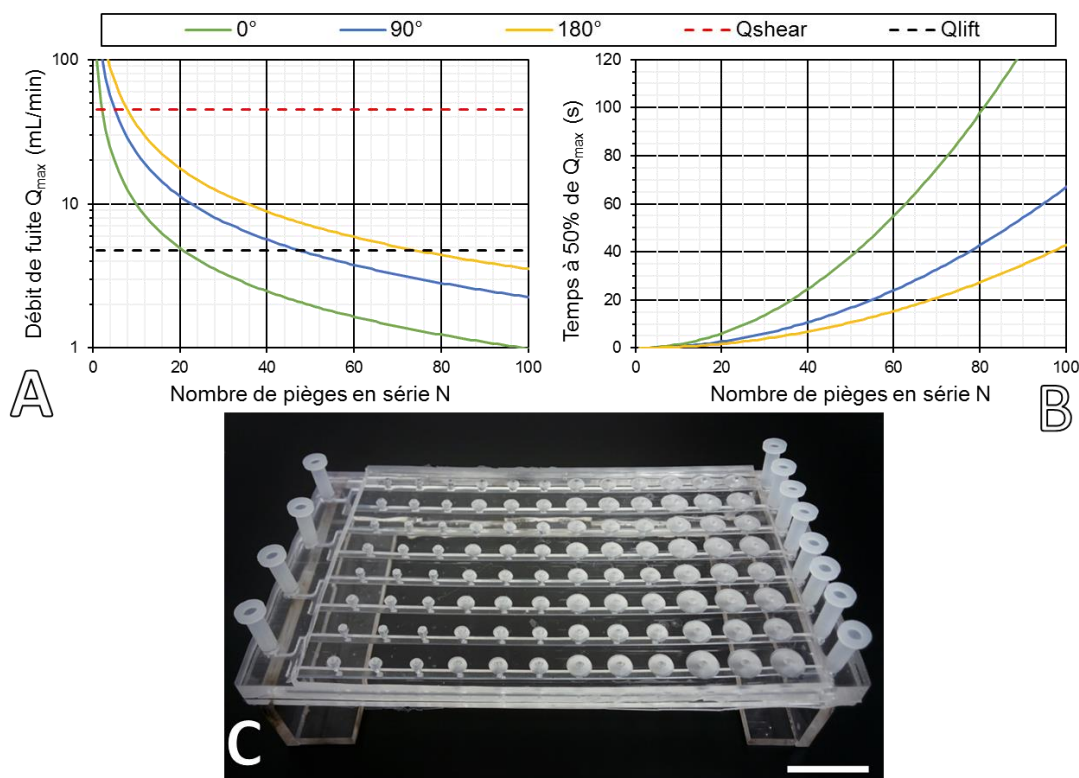


Figure 5-1 : Intersection entre le remplissage et l'opération de PMÉ à gouttelettes. (A) Les débits maximums de fuite Q_{\max} et (B) le temps de remplissage avec un débit égal à 50 % de Q_{\max} pour un dispositif parfaitement hydrophile (0°), hydrophobe (180°) et ni l'un ni l'autre (90°) en fonction du nombre de gouttelettes en série N . Le débit critique de cisaillement des tissus et d'éjection des tissus pour les dimensions. (C) Photo d'un exemple de PMÉ à gouttelettes compatible avec une plaque microtitre à 96 puits (reproduite avec la permission d'Amélie St-Georges Robillard).

Deux observations intéressantes sont tirées des résultats de la Figure 5-1 : (1) La sous-figure A de la Figure 5-1 montre qu'augmenter le nombre de pièges en série protège indirectement les tissus en diminuant le débit de fuite du dispositif. En d'autres termes, le dispositif se met à fuir avant que les tissus soient soumis à des contraintes de cisaillement élevées. (2) La sous-figure B de la Figure 5-1 montre que même en restant bien en deçà du débit maximum d'opération (50 %), il est possible de remplir plus de 96 puits en moins de deux minutes. Cependant, ces calculs ne considèrent pas le volume des canaux secondaires tels que représentés à la Figure 2-2 qui viennent doubler ou tripler le volume à remplir dépendamment de leur taille (variation du volume du canal secondaire visible à la sous-figure C de la Figure 5-1). Le temps de remplissage reste tout de même en deçà de six minutes même dans le pire cas.

En sachant que c'est le nombre de dispositifs en série N qui limite le débit de remplissage, il est aussi possible de concevoir un dispositif comme à la Figure 5-1C qui dispose plusieurs rangées en parallèle de pièges en série. Ceci limite N , permet un Q_{max} plus élevé et donc de remplir 96 puits en quelques secondes. Ces observations démontrent qu'en combinant les types de PMÉ et en étudiant rigoureusement les effets sur les tissus piégés, il est possible de concevoir des dispositifs qui limitent intrinsèquement les débits tout en assurant leur utilité pratique.

Selon la Figure 5-1, indépendamment de l'hydrophobicité des parois du dispositif, il faut (1) un minimum de 8 et un maximum de 20 pièges en série pour éviter une contrainte de cisaillement dommageable τ_{max} tout en permettant d'éjecter les tissus et (2) un minimum de 76 pièges en série pour piéger indéfiniment les tissus. Encore indépendamment de l'hydrophobicité, un maximum de 62 pièges en série assure un remplissage en deçà d'une minute et 88 pièges en deçà de deux minutes.

5.3 Limitations de la méthodologie

Les résultats de l'analyse biologique effectuée dans ce mémoire se limitent à des résultats de simulation numérique. Afin d'assurer la validité biologique des résultats de simulation, une recherche large dans la littérature sur les différents paramètres de consommation de tissus dans des modèles tissulaires 3D a été effectuée. Les résultats de plus de 30 articles publiés entre 1966 et 2014 ont été compilés et révisés pour produire le premier tableau publié dans l'article dans le cadre de ce mémoire (Table 4-1). Le défi principal provenant de cette recherche bibliographique est que les paramètres soient dépendants du type de cellule, de l'environnement immédiat du tissu, de la technique de mesure et de l'avancement des connaissances au moment de la publication. La revue critique a été effectuée pour les paramètres de diffusion, de solubilité et de consommation du glucose et de l'oxygène par des tissus mammaliens soit en suspensions cellulaires, cultures cellulaires, sphéroïdes ou biopsies.

CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

L'intérêt qui a été suscité par les résultats de ce mémoire chez des chercheurs dans le domaine de la biologie et de l'ingénierie de système démontre clairement son importance; notamment par le nombre de contributions à des publications. Les règles de conception de PMÉ ont été soumises pour publication au journal *Scientific Reports*. Les résultats du mémoire ont aussi fait l'objet d'une figure et d'une section d'analyse de dispositifs dans un article à concentration biologique (Astolfi et al. dans *Lab on a chip* [22]) et contribueront prochainement à un article multidisciplinaire à concentration biologique et d'ingénierie de système (Marimuthu et al., figures à l'annexe C). De plus, certaines des figures produites par les simulations numériques ont été incluses dans des présentations orales et affiches présentées dans des conférences internationales par Méлина Astolfi (*MicroTAS 2015*) [10], Thomas Gervais (*SPIE Photonics West 2016: BiOS*) [28] Mohana Marimuthu (*MicroTAS 2015*) [26] et Mohammed Abdul Lateef (*Canadian Urology Association – 71st Annual Meeting*) [29]. En tout, les collaborations issues de cette recherche contribueront à la publication de trois articles de journaux et à quatre présentations dans des conférences internationales.

Les modèles analytiques résumés au Chapitre 2 et au Chapitre 3 sur les effets de formation de gouttelette, de remplissage de dispositif, de transport de nutriments et d'hydrodynamique présentent une analyse rigoureuse des pièges microfluidiques à échantillons et des PMÉ à gouttelettes. Les résultats des simulations numériques complètent cette analyse avec des règles de conception plus strictes et mieux définies soumises pour publication et présentées au Chapitre 4. Ces règles ont été comparées entre elles et les limitations de l'étude ont été discutées au Chapitre 5. Enfin, l'objectif principal du projet qui était de consolider la compréhension de la conception et de l'opération de pièges microfluidiques à échantillons (PMÉ) en utilisant des modèles analytiques et des simulations numériques a été atteint.

Les conclusions du projet circonscrivent aussi d'autres projets multidisciplinaires aussi importants dans les domaines de la biologie, de l'ingénierie, de la physique et des mathématiques. La suite naturelle de ce projet de modélisation se sépare en deux applications. (1) Il est possible de pousser les modèles biologiques pour augmenter leur pertinence et explorer une autre dimension de la modélisation de systèmes. La modélisation multiéchelle appuyée par des expériences biologiques systématiques est une avenue intéressante pour atteindre cet objectif. (2) Il est aussi

possible de pousser les modèles de remplissage pour prédire précisément la dynamique capillaire dans un dispositif microfluidique. L'utilisation de méthodes numériques simples (ex. méthode d'Euler) avec des analyses matricielles (Hagen-Poiseuille, équations de maille et algèbre linéaire) permettrait d'atteindre cet objectif. Ces deux applications ont été brièvement explorées dans le cadre de ce mémoire et sont une nouveauté en modélisation microfluidique.

Bien que l'analyse établie dans ce mémoire se concentre principalement sur une application strictement biologique des pièges microfluidiques à échantillons, les résultats hydrodynamiques s'appliquent aussi à des éléments inorganiques. Ceci élargit les champs d'application des résultats du mémoire à tous les domaines de la microfluidique et non seulement à l'application spécifique à la recherche contre le cancer, car les PMÉ peuvent aussi servir à piéger et relâcher de façon reproductible des minéraux, billes et autres échantillons sous-millimétriques.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] RCCS, « Cancer du sein - Les temps d'attente au Canada », 2008.
- [2] C. Nezelof, « Pourquoi attendre longtemps un diagnostic de cancer? », *Le Figaro*, 25-janv-2012.
- [3] S. Boulenger et F. Vaillancourt, « Temps d'attente dans le secteur public de la santé au Québec : mesure, conséquences et moyens pour les réduire », Montréal, 2013.
- [4] A. M. Ghaemmaghami, M. J. Hancock, H. Harrington, H. Kaji, et A. Khademhosseini, « Biomimetic tissues on a chip for drug discovery », *Drug Discov. Today*, vol. 17, n° 3- 4, p. 173- 181, févr. 2012.
- [5] R.-Z. Lin et H.-Y. Chang, « Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research », *Biotechnol. J.*, vol. 3, n° 9- 10, p. 1172- 1184, oct. 2008.
- [6] N. T. Elliott et F. Yuan, « A Review of Three-Dimensional In Vitro Tissue Models for Drug Discovery and Transport Studies », *J. Pharm. Sci.*, vol. 100, n° 1, p. 59- 74, janv. 2011.
- [7] G. Mehta, A. Y. Hsiao, M. Ingram, G. D. Luker, et S. Takayama, « Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy », *J. Control. Release*, vol. 164, n° 2, p. 192- 204, 2012.
- [8] M. Astolfi, « Tumeurs micro-disséquées sur puce microfluidique », École Polytechnique de Montréal, 2015.
- [9] B. J. Green, T. Saberi Safaei, A. Mephram, M. Labib, R. M. Mohamadi, et S. O. Kelley, « Beyond the Capture of Circulating Tumor Cells: Next-Generation Devices and Materials », *Angew. Chemie - Int. Ed.*, p. 1252- 1265, 2015.
- [10] M. Astolfi, A. L. Mohammed, B. Péant, J. Kendall-Dupont, N. Rousset, F. Saad, D. Provencher, A.-M. Mes-Masson, et T. Gervais, « Beyond Spheroids: Human Micro-Dissected Tumors as a Patient-Specific Model to Predict Treatment Response », dans *MicroTAS 2015*, 2015, p. 3.
- [11] J.-P. Frimat, M. Becker, Y.-Y. Chiang, U. Marggraf, D. Janasek, J. G. Hengstler, J. Franzke, et J. West, « A microfluidic array with cellular valving for single cell co-culture », *Lab Chip*, vol. 11, n° 2, p. 231- 237, 2011.

- [12] J. Lee et M. A. Burns, « Asymmetric traps array for particle transport », *RSC Adv.*, vol. 5, n° 5, p. 3358- 3364, 2015.
- [13] K. Chung, Y. Kim, J. S. Kanodia, E. Gong, S. Y. Shvartsman, et H. Lu, « A microfluidic array for large-scale ordering and orientation of embryos. », *Nat. Methods*, vol. 8, n° 2, p. 171- 176, 2011.
- [14] I. V. Kukhtevich, K. I. Belousov, A. S. Bukatin, M. V. Dubina, et A. A. Evstrapov, « A microfluidic chip with hydrodynamic traps for in vitro microscopic investigations of single cells », *Tech. Phys. Lett.*, vol. 41, n° 3, p. 255- 258, 2015.
- [15] P. Occhetta, M. Licini, A. Redaelli, et M. Rasponi, « Design of a microfluidic strategy for trapping and screening single cells », *Med. Eng. Phys.*, vol. 0, p. 1- 8, 2015.
- [16] T. D. Perroud et K. D. Patel, « Methods and devices for immobilization of single particles in a virtual channel in a hydrodynamic trap », 8,815,177 B2, 2014.
- [17] A. Karimi, S. Yazdi, et A. M. Ardekani, « Hydrodynamic mechanisms of cell and particle trapping in microfluidics », *Biomicrofluidics*, vol. 7, n° 2, 2013.
- [18] H. Ota, R. Yamamoto, K. Deguchi, Y. Tanaka, Y. Kazoe, Y. Sato, et N. Miki, « Three-dimensional spheroid-forming lab-on-a-chip using micro-rotational flow », *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 147, n° 1, p. 359- 365, mai 2010.
- [19] M. G. Lee, J. H. Shin, C. Y. Bae, S. Choi, et J.-K. Park, « Label-Free Cancer Cell Separation from Human Whole Blood Using Inertial Microfluidics at Low Shear Stress », *Anal. Chem.*, vol. 85, n° 13, p. 6213- 6218, juill. 2013.
- [20] S. K. Ameri, P. K. Singh, et S. Sonkusale, « Utilization of graphene electrode in transparent microwell arrays for high throughput cell trapping and lysis », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 61, p. 625- 630, 2014.
- [21] M. Bocchi, L. Rambelli, A. Faenza, L. Giulianelli, N. Pecorari, E. Duqi, J.-C. Gallois, et R. Guerrieri, « Inverted open microwells for cell trapping, cell aggregate formation and parallel recovery of live cells », *Lab Chip*, vol. 12, n° 17, p. 3168, 2012.
- [22] M. Astolfi, B. Péant, M. A. Lateef, N. Rousset, J. Kendall-Dupont, E. Carmona, F. Monet, F. Saad, D. Provencher, A.-M. Mes-Masson, et T. Gervais, « Micro-dissected tumor tissues

- on chip: an ex vivo method for drug testing and personalized therapy », *Lab Chip*, vol. 16, n° 2, p. 312- 325, 2016.
- [23] T. Anada, J. Fukuda, Y. Sai, et O. Suzuki, « An oxygen-permeable spheroid culture system for the prevention of central hypoxia and necrosis of spheroids », *Biomaterials*, vol. 33, n° 33, p. 8430- 8441, 2012.
- [24] M. Khabiry, B. G. Chung, M. J. Hancock, H. C. Soundararajan, Y. Du, D. Cropek, W. G. Lee, et a. U. Khademhosseini, « Cell docking in double grooves in a microfluidic channel », *Small*, vol. 5, n° 10, p. 1186- 1194, 2009.
- [25] B. Patra, C.-C. Peng, W.-H. Liao, C.-H. Lee, et Y.-C. Tung, « Drug testing and flow cytometry analysis on a large number of uniform sized tumor spheroids using a microfluidic device », *Sci. Rep.*, vol. 6, n° October 2015, p. 21061, 2016.
- [26] M. Marimuthu, N. Rousset, M. Pareek, S. B. Beaudoin, A.-M. Mes-Masson, et T. Gervais, « Single Inlet Multi-Size Spheroid Synthesis Chip (SIMSS Chip) », dans *MicroTAS 2015*, 2015, p. 3.
- [27] O. Frey, P. M. Misun, D. a Fluri, J. G. Hengstler, et A. Hierlemann, « Reconfigurable microfluidic hanging drop network for multi-tissue interaction and analysis. », *Nat. Commun.*, vol. 5, n° May, p. 4250, 2014.
- [28] M. Astolfi, A. St-Georges-Robillard, N. Rousset, L. A. Muhammad, B. Péant, M. Marimuthu, J. Kendall-Dupont, B. Patra, E. Carmona, F. Saad, D. Provencher, A.-M. Mes-Masson, F. Leblond, et T. Gervais, « Micro-dissected tumors on-chip : using microfluidics and fluorescence imaging for personalized drug response assays », dans *SPIE Photonics West 2016: BIOS*, 2016.
- [29] M. A. Lateef, B. Péant, N. Rousset, K. Simeone, J. Kendall-Dupont, A. M. Orimoto, A.-M. Mes-Masson, T. Gervais, et F. Saad, « Rapid prediction of personalized response to chemotherapy using sub-millimeter ex vivo biopsy samples on chip », *CUA 71st Annual Meeting - Mobis*, 2016. [En ligne]. Disponible à: <https://cua.tech4pco.com/mobis/lecture/142>.
- [30] B. Hagemeyer, F. Zechall, et M. Stelzle, « Towards plug and play filling of microfluidic devices by utilizing networks of capillary stop valves », *Biomicrofluidics*, vol. 8, n° 5, p.

56501, sept. 2014.

- [31] J. Monahan, A. A. Gewirth, et R. G. Nuzzo, « A Method for Filling Complex Polymeric Microfluidic Devices and Arrays », *Anal. Chem.*, vol. 73, n° 13, p. 3193-3197, juill. 2001.
- [32] M. a Eddings et B. K. Gale, « A PDMS-based gas permeation pump for on-chip fluid handling in microfluidic devices », *J. Micromechanics Microengineering*, vol. 16, n° 11, p. 2396-2402, nov. 2006.
- [33] J. H. Kang, Y. C. Kim, et J.-K. Park, « Analysis of pressure-driven air bubble elimination in a microfluidic device », *Lab Chip*, vol. 8, n° 1, p. 176-178, 2008.
- [34] R. Seemann, M. Brinkmann, E. J. Kramer, F. F. Lange, et R. Lipowsky, « Wetting morphologies at microstructured surfaces », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 102, n° 6, p. 1848-1852, févr. 2005.
- [35] K. W. Oh, K. Lee, B. Ahn, et E. P. Furlani, « Design of pressure-driven microfluidic networks using electric circuit analogy », *Lab Chip*, vol. 12, n° 3, p. 515-545, 2012.
- [36] R. Safavieh et D. Juncker, « Capillarics: pre-programmed, self-powered microfluidic circuits built from capillary elements. », *Lab Chip*, vol. 13, n° 21, p. 4180-9, nov. 2013.
- [37] P. Concus et R. Finn, « Capillary Wedges Revisited », *SIAM J. Math. Anal.*, vol. 27, n° 1, p. 56-69, janv. 1996.
- [38] Y. Liu, D. D. Nolte, et L. J. Pyrak-Nolte, « Pinned films and capillary hysteresis in microfluidic channels. », *Lab Chip*, vol. 12, n° 16, p. 2858-64, août 2012.
- [39] P. Vulto, S. Podszun, P. Meyer, C. Hermann, A. Manz, et G. a Urban, « Phaseguides: a paradigm shift in microfluidic priming and emptying. », *Lab Chip*, vol. 11, n° 9, p. 1596-602, mai 2011.
- [40] B. J. (Brian J. Kirby, *Micro- and nanoscale fluid mechanics : transport in microfluidic devices*. Cambridge University Press, 2010.
- [41] E. W. Washburn, « The Dynamics of Capillary Flow », *Phys. Rev.*, vol. 17, n° 3, p. 273-283, mars 1921.
- [42] P. Estienne et A. Godard, *Climatologie*. Paris, 1970.

- [43] H. Bruus, *Theoretical Microfluidics Oxford Master Series in Condensed Matter Physics*. Oxford University Press, 2007.
- [44] P.-G. de Gennes, F. Brochard-Wyart, et D. Quéré, *Capillarity and Wetting Phenomena*. New York, NY: Springer New York, 2004.
- [45] J. Eggers et T. F. Dupont, « Drop formation in a one-dimensional approximation of the Navier–Stokes equation », *J. Fluid Mech.*, vol. 262, n° 1, p. 205, oct. 1994.
- [46] M. Van Dyke, *An Album of Fluid Motion*, 14th Editi. Stanford, United States: Parabolic Press, Inc., 1982.
- [47] J. Happel et E. Bart, « The settling of a sphere along the axis of a long square duct at low Reynolds' number », *Appl. Sci. Res.*, vol. 29, n° 1, p. 241-258, 1974.
- [48] D. Song, R. K. Gupta, et R. P. Chhabra, « Wall Effects on a Sphere Falling in Quiescent Power Law Fluids in Cylindrical Tubes », *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 48, n° 12, p. 5845-5856, juin 2009.
- [49] W. L. Haberman et R. M. Sayre, « Motion of rigid and fluid spheres in stationary and moving liquids inside cylindrical tubes. », *David Taylor Model Basin Report, Washingt. D. C., U. S. Navy Dept.*, 1958.
- [50] A. W. Francis, « Wall Effect in Falling Ball Method for Viscosity », *Physics (College. Park. Md).*, vol. 4, n° 11, p. 403, 1933.
- [51] J. Happel et H. Brenner, *Low Reynolds number hydrodynamics: with special applications to particulate media*, Prentice-H. Englewood Cliffs, N.J.: Springer Science & Business Media, 1983.
- [52] J. Happel et H. Brenner, « Wall Effects on the Motion of a Single Particle », Springer Netherlands, 1983, p. 286-357.
- [53] J. P. Fisher, *Tissue engineering : principles and practices*. CRC Press, 2013.
- [54] E. S. ASMOLOV, « The inertial lift on a spherical particle in a plane Poiseuille flow at large channel Reynolds number », *Journal of Fluid Mechanics*, vol. 381. p. 63-87, 1999.
- [55] G. Choi, R. Glowinski, H. Hu, T. Ko, D. Ocano, P. Singh, W. Pan, N. Patankar, J. Wang, V. Sarin, N. C. C. Goali, et E. Sciences, « Slip Velocity , Lift and Correlations », 2002.

- [56] D. Di Carlo, D. Irimia, R. G. Tompkins, et M. Toner, « Continuous inertial focusing, ordering, and separation of particles in microchannels. », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, n° 48, p. 18892-7, nov. 2007.
- [57] C. Liu, C. Xue, J. Sun, et G. Hu, « A generalized formula for inertial lift on a sphere in microchannels », *Lab Chip*, 2016.
- [58] C. Eckart, « Variation Principles of Hydrodynamics », *Phys. Fluids*, vol. 3, n° 3, p. 421, 1960.
- [59] D. D. JOSEPH et D. OCANDO, « Slip velocity and lift », *J. Fluid Mech.*, vol. 454, n° October 2000, p. 263, mars 2002.
- [60] J. Teng, *Micro Process Engineering*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009.
- [61] D. A. Wolff et H. Pertoft, « Separation of HeLa cells by colloidal silica density gradient centrifugation. I. Separation and partial synchrony of mitotic cells. », *J. Cell Biol.*, vol. 55, n° 3, p. 579-85, déc. 1972.
- [62] M. G. Urbanek, E. B. Picken, L. K. Kalliainen, et W. M. Kuzon, « Specific Force Deficit in Skeletal Muscles of Old Rats Is Partially Explained by the Existence of Denervated Muscle Fibers », *Journals Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.*, vol. 56, n° 5, p. B191-B197, mai 2001.
- [63] A. K. Bryan, A. Goranov, A. Amon, et S. R. Manalis, « Measurement of mass, density, and volume during the cell cycle of yeast », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 107, n° 3, p. 999-1004, janv. 2010.
- [64] B. Yang, J. Wang, D. Joseph, et H. Hu, « Numerical study of particle migration in tube and plane Poiseuille flows », ... *to Multiph. Flow*, n° 2005, 2006.
- [65] P. G. Saffman, « The lift on a small sphere in a slow shear flow », *J. Fluid Mech.*, vol. 22, n° 2, p. 385, juin 1965.
- [66] K. a. Johnson et R. S. Goody, « The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis–Menten Paper », *Biochemistry*, vol. 50, n° 39, p. 8264-8269, oct. 2011.
- [67] D. a Markov, E. M. Lillie, S. P. Garbett, et L. J. McCawley, « Variation in diffusion of gases

- through PDMS due to plasma surface treatment and storage conditions. », *Biomed. Microdevices*, vol. 16, n° 1, p. 91-6, févr. 2014.
- [68] H. Shiku, T. Saito, C.-C. Wu, T. Yasukawa, M. Yokoo, H. Abe, T. Matsue, et H. Yamada, « Oxygen Permeability of Surface-modified Poly(dimethylsiloxane) Characterized by Scanning Electrochemical Microscopy », *Chem. Lett.*, vol. 35, n° 2, p. 234-235, 2006.
- [69] Wisent Bioproducts, « RPMI 1640, 1X Formulation ». [En ligne]. Disponible à : <http://www.wisentbioproducts.com/en/classical-basal-media-liquid/151-rpmi-1640-1x.html>. [Consulté le: 25-juin-2016].
- [70] N. C. L. Zembruski, V. Stache, W. E. Haefeli, et J. Weiss, « 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry », *Anal. Biochem.*, vol. 429, n° 1, p. 79-81, oct. 2012.
- [71] I. Vermes, C. Haanen, H. Steffens-Nakken, et C. Reutellingsperger, « A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V », *J. Immunol. Methods*, vol. 184, n° 1, p. 39-51, juill. 1995.
- [72] M. K. Kwan, E. J. Wall, J. Massie, et S. R. Garfin, « Strain, stress and stretch of peripheral nerve Rabbit experiments in vitro and in vivo », *Acta Orthop. Scand.*, vol. 63, n° 3, p. 267-272, janv. 1992.
- [73] S. Dimmeler, J. Haendeler, V. Rippmann, M. Nehls, et A. M. Zeiher, « Shear stress inhibits apoptosis of human endothelial cells », *FEBS Lett.*, vol. 399, n° 1-2, p. 71-74, déc. 1996.
- [74] D. Maggiorani, R. Dissard, M. Belloy, J.-S. Saulnier-Blache, A. Casemayou, L. Ducasse, S. Grès, J. Bellière, C. Caubet, J.-L. Bascands, J. P. Schanstra, et B. Buffin-Meyer, « Shear Stress-Induced Alteration of Epithelial Organization in Human Renal Tubular Cells », *PLoS One*, vol. 10, n° 7, p. e0131416, juill. 2015.
- [75] C. K. M. Ip, S.-S. Li, M. Y. H. Tang, S. K. H. Sy, Y. Ren, H. C. Shum, et A. S. T. Wong, « Stemness and chemoresistance in epithelial ovarian carcinoma cells under shear stress », *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 26788, juin 2016.
- [76] J. W. Song, W. Gu, N. Futai, K. A. Warner, J. E. Nor, et S. Takayama, « Computer-Controlled Microcirculatory Support System for Endothelial Cell Culture and Shearing », *Anal. Chem.*, vol. 77, n° 13, p. 3993-3999, juill. 2005.

- [77] Y. Chisti, « Hydrodynamic Damage to Animal Cells », *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 21, n° 2, p. 67-110, janv. 2001.
- [78] D. Di Carlo, L. Y. Wu, et L. P. Lee, « Dynamic single cell culture array », *Lab Chip*, vol. 6, n° 11, p. 1445, 2006.
- [79] M. Al-Rubeai et R. P. Singh, « Apoptosis in cell culture », *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 9, n° 2, p. 152-156, avr. 1998.
- [80] S. Akimoto, M. Mitsumata, T. Sasaguri, et Y. Yoshida, « Laminar Shear Stress Inhibits Vascular Endothelial Cell Proliferation by Inducing Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p21Sdi1/Cip1/Waf1 », *Circ. Res.*, vol. 86, n° 2, p. 185-190, févr. 2000.
- [81] I. Rizvi, U. A. Gurkan, S. Tasoglu, N. Alagic, J. P. Celli, L. B. Mensah, Z. Mai, U. Demirci, et T. Hasan, « Flow induces epithelial-mesenchymal transition, cellular heterogeneity and biomarker modulation in 3D ovarian cancer nodules », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 110, n° 22, p. E1974-E1983, mai 2013.
- [82] F. Kurth, K. Eyer, A. Franco-Obregón, et P. S. Dittrich, « A new mechanobiological era: microfluidic pathways to apply and sense forces at the cellular level », *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 16, n° 3-4, p. 400-408, août 2012.
- [83] J. Dong, Y. Gu, C. Li, C. Wang, Z. Feng, R. Qiu, B. Chen, J. Li, S. Zhang, Z. Wang, et J. Zhang, « Response of mesenchymal stem cells to shear stress in tissue-engineered vascular grafts », *Acta Pharmacol. Sin.*, vol. 30, n° 5, p. 530-536, mai 2009.
- [84] J. J. Casciari, S. V Sotirchos, et R. M. Sutherland, « Variations in tumor cell growth rates and metabolism with oxygen concentration, glucose concentration, and extracellular pH. », *J. Cell. Physiol.*, vol. 151, n° 2, p. 386-94, mai 1992.
- [85] W. Mueller-Klieser, J. P. Freyer, et R. M. Sutherland, « Influence of glucose and oxygen supply conditions on the oxygenation of multicellular spheroids. », *Br. J. Cancer*, vol. 53, n° 3, p. 345-53, mars 1986.
- [86] R. Venkatasubramanian, M. a. Henson, et N. S. Forbes, « Incorporating energy metabolism into a growth model of multicellular tumor spheroids », *J. Theor. Biol.*, vol. 242, p. 440-453, 2006.

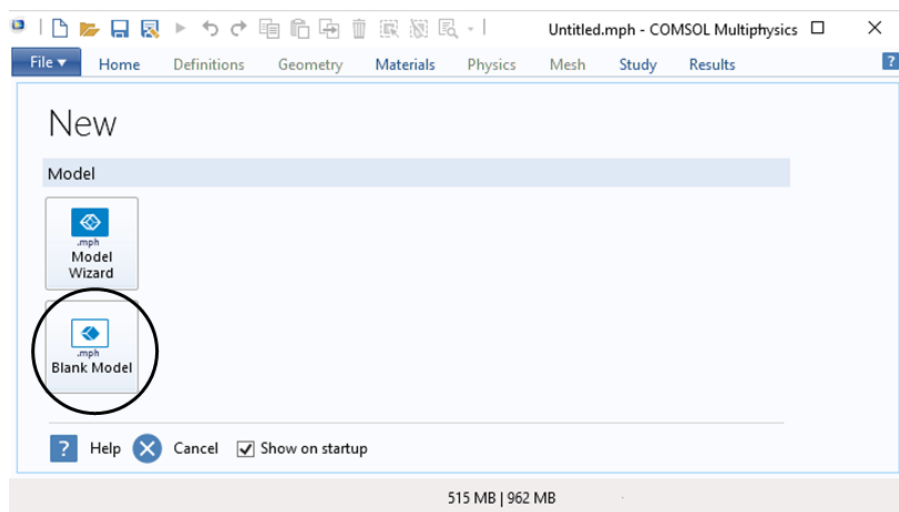
- [87] M. L. Acosta, A. Sánchez, F. García, A. Contreras, et E. Molina, « Analysis of kinetic, stoichiometry and regulation of glucose and glutamine metabolism in hybridoma batch cultures using logistic equations », *Cytotechnology*, vol. 54, p. 189-200, 2007.
- [88] R. Venkatasubramanian, M. a. Henson, et N. S. Forbes, « Integrating cell-cycle progression, drug penetration and energy metabolism to identify improved cancer therapeutic strategies », *J. Theor. Biol.*, vol. 253, p. 98-117, 2008.
- [89] A. Friedman, *Tutorials in Mathematical Biosciences III*, vol. 1872. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2006.
- [90] Y. Jiang, J. Pjesivac-Grbovic, C. Cantrell, et J. P. Freyer, « A multiscale model for avascular tumor growth. », *Biophys. J.*, vol. 89, n° 6, p. 3884-3894, 2005.
- [91] S. Chakraborty, V. Balakotaiah, et A. Bidani, « Multiscale model for pulmonary oxygen uptake and its application to quantify hypoxemia in hepatopulmonary syndrome », *J. Theor. Biol.*, vol. 244, n° 2, p. 190-207, 2007.
- [92] N. E. Timmins et L. K. Nielsen, « Generation of Multicellular Tumor Spheroids by the Hanging-Drop Method », 2007, p. 141-151.
- [93] Y.-C. Tung, A. Y. Hsiao, S. G. Allen, Y. Torisawa, M. Ho, et S. Takayama, « High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. », *Analyst*, vol. 136, n° 3, p. 473-8, févr. 2011.
- [94] R. Foty, « A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids. », *J. Vis. Exp.*, vol. 20, n° 51, p. 4-7, 2011.
- [95] N. Timmins, S. Dietmair, et L. Nielsen, « Hanging-drop multicellular spheroids as a model of tumour angiogenesis », *Angiogenesis*, vol. 7, n° 2, p. 97-103, 2004.
- [96] A. Y. Hsiao, Y.-C. Tung, C.-H. Kuo, B. Mosadegh, R. Bedenis, K. J. Pienta, et S. Takayama, « Micro-ring structures stabilize microdroplets to enable long term spheroid culture in 384 hanging drop array plates. », *Biomed. Microdevices*, vol. 14, n° 2, p. 313-23, avr. 2012.
- [97] D. R. Grimes, C. Kelly, K. Bloch, et M. Partridge, « A method for estimating the oxygen consumption rate in multicellular tumour spheroids », *J. R. Soc. Interface*, vol. 11, n° 92, p. 20131124-20131124, janv. 2014.

ANNEXE A – MÉTHODOLOGIE D’UTILISATION DU LOGICIEL COMSOL MULTIPHYSICS® POUR EFFECTUER DES BALAYAGES PARAMÉTRIQUES ET DES MESURES DE FORCES RÉACTIVES

Cette annexe présente comment utiliser *COMSOL Multiphysics*® pour reproduire les résultats du mémoire. Les étapes générales à suivre pour l’analyse d’un problème par la méthode des éléments finis sont décrites brièvement à la Figure 1-4. Ces étapes générales sont : (1) dessiner la géométrie, (2) définir les phénomènes physiques, conditions aux frontières et dans les domaines, (3) faire le maillage du domaine d’intérêt, (4) résoudre le problème dans le domaine, (5) présenter les résultats de façon graphique.

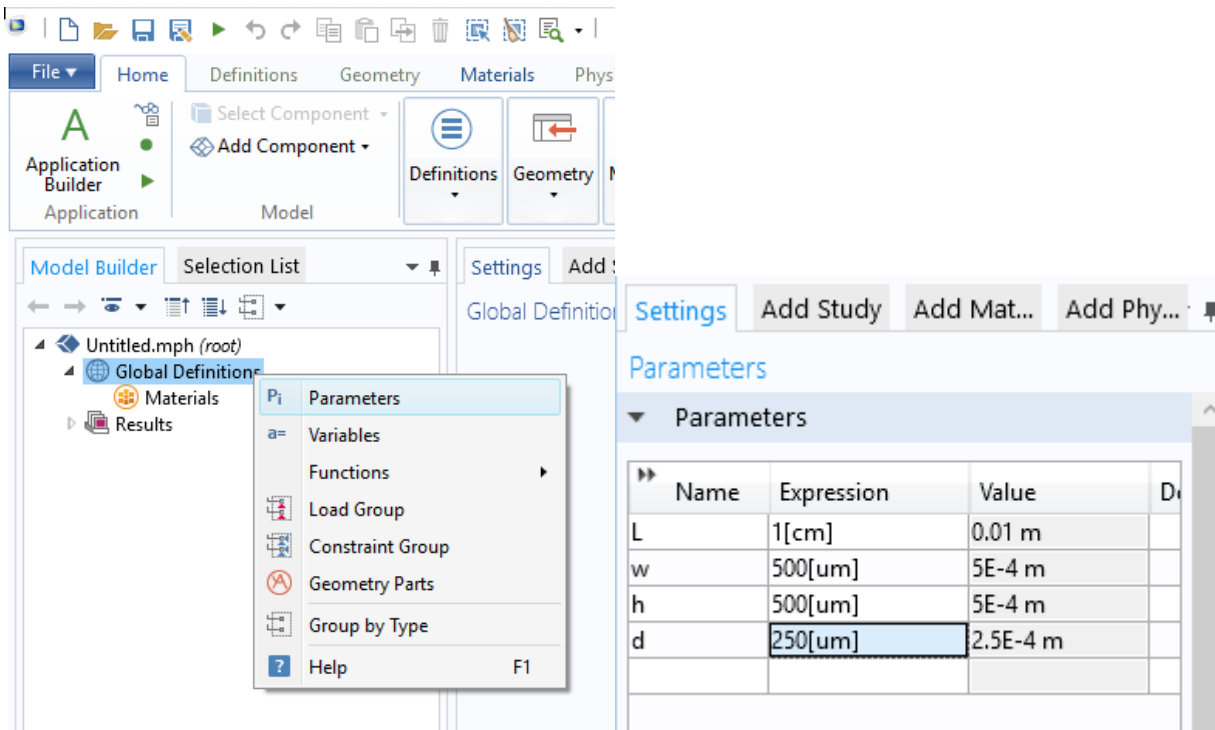
Dépendamment du logiciel, il est nécessaire d’effectuer certaines étapes préliminaires de définition des paramètres, constantes, fonctions et couplages avant chaque étape générale. Ce tutoriel est axé sur l’utilisation de la version 5.2 de *COMSOL Multiphysics*® pour arriver aux résultats de contraintes de cisaillement et portance publiés à la Figure 4-3. Cependant, les principes généraux sont applicables à toutes les implémentations logicielles de la méthode des éléments finis.

En partant d’un nouveau fichier vide *.mph* (format de fichier propriétaire de *COMSOL Multiphysics*®), les étapes suivantes sont suivies.

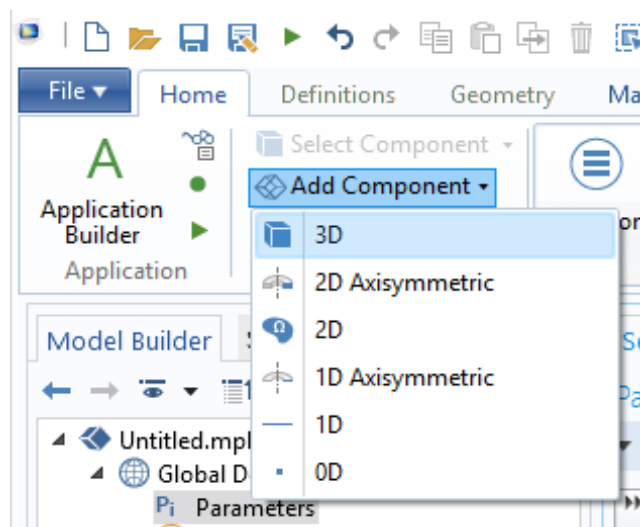


1 Dessin

Étape préliminaire : Définition de l’expression des paramètres géométriques L, w, h, d tels que définis à la sous-figure 1 de la Figure 1-3 dans le nœud « Global Definitions → Parameters ».



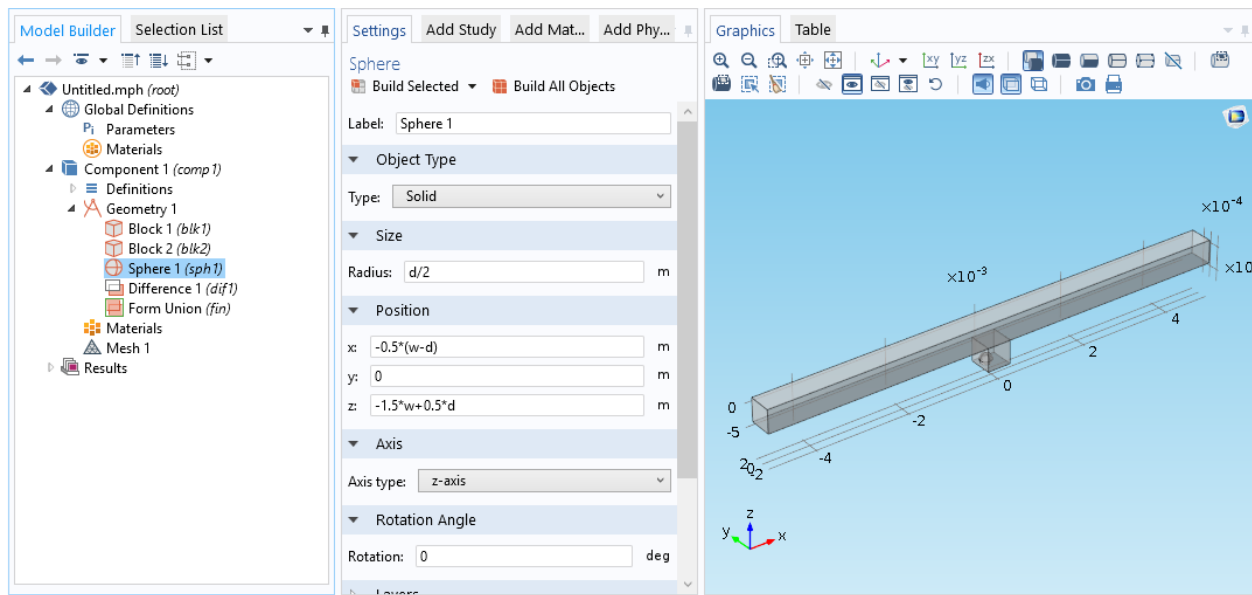
Ajout d'un nœud de géométrie 3D avec le bouton « Add Component » et l'option « 3D ».



Dessin du dispositif dans le nœud « Component 1 → Geometry » avec les fonctions disponibles suivantes :

- Formes primitives (prismes, cylindres, sphères, cônes, etc.)
- Opérateurs booléens (union, intersection, différence, etc.)
- Transformations (balayage, miroir, rotation, etc.)

Pour les résultats de l'article, un prisme horizontal à base carrée de longueur L et de base $A = w \times w$ dont le centre est positionné à l'origine génère le canal principal. Un prisme à base carrée de longueur h et de base $w \times w$ dont le centre est positionné à une distance verticale $-w$ de l'origine génère le piège microfluidique. Une sphère de diamètre d dont le centre est positionné à une distance $-1.5w + 0.5d$ verticale et une distance $-0.5(w - d)$ horizontale de l'origine (fixée en aval au fond du piège). La différence entre les prismes et la sphère donnent le volume de liquide à modéliser. Il est possible d'ajouter un axe de symétrie en ne dessinant que la moitié du domaine.



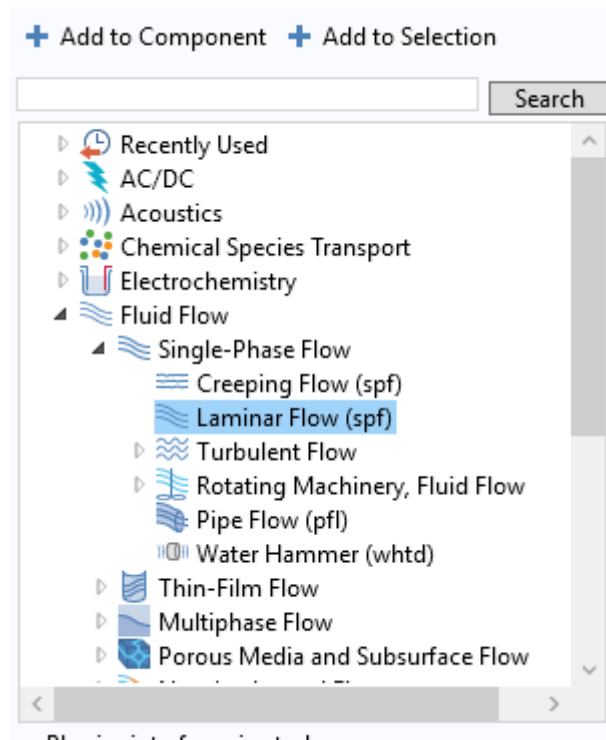
2 Physique

Étape préliminaire : Définitions des paramètres de la physique Q_e, ρ, η, ρ_T tels que nécessaires pour les équations à étudier définies à l'équation (3-14) et aux figures précédentes (Figure 3-2, Figure 3-6 et Figure 3-8) dans le nœud « Global Definitions → Parameters ».

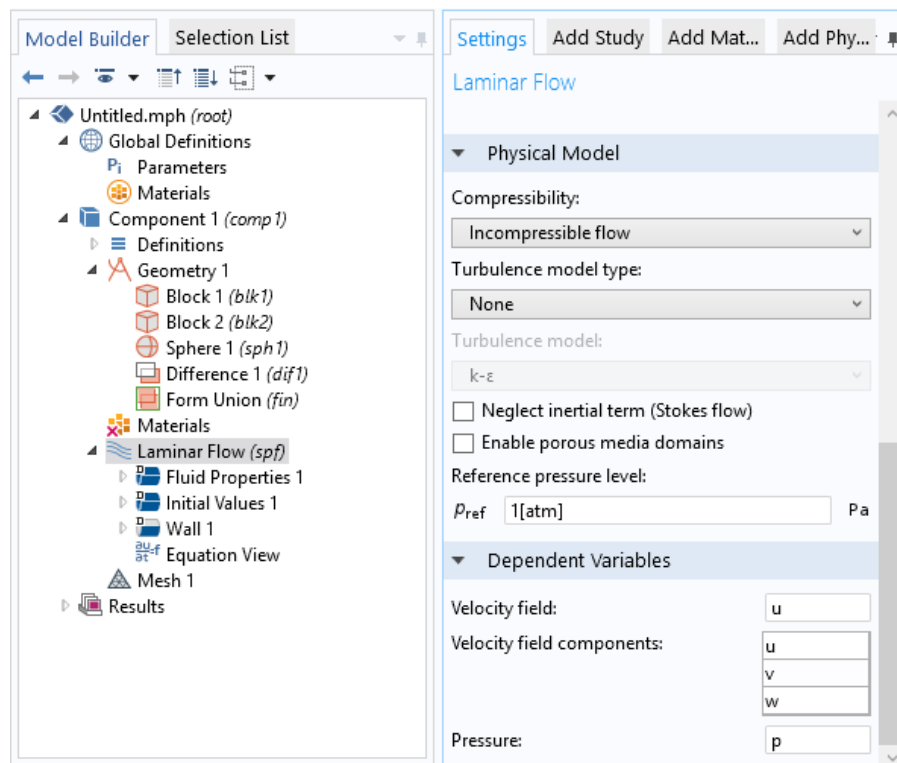
Parameters

Parameters

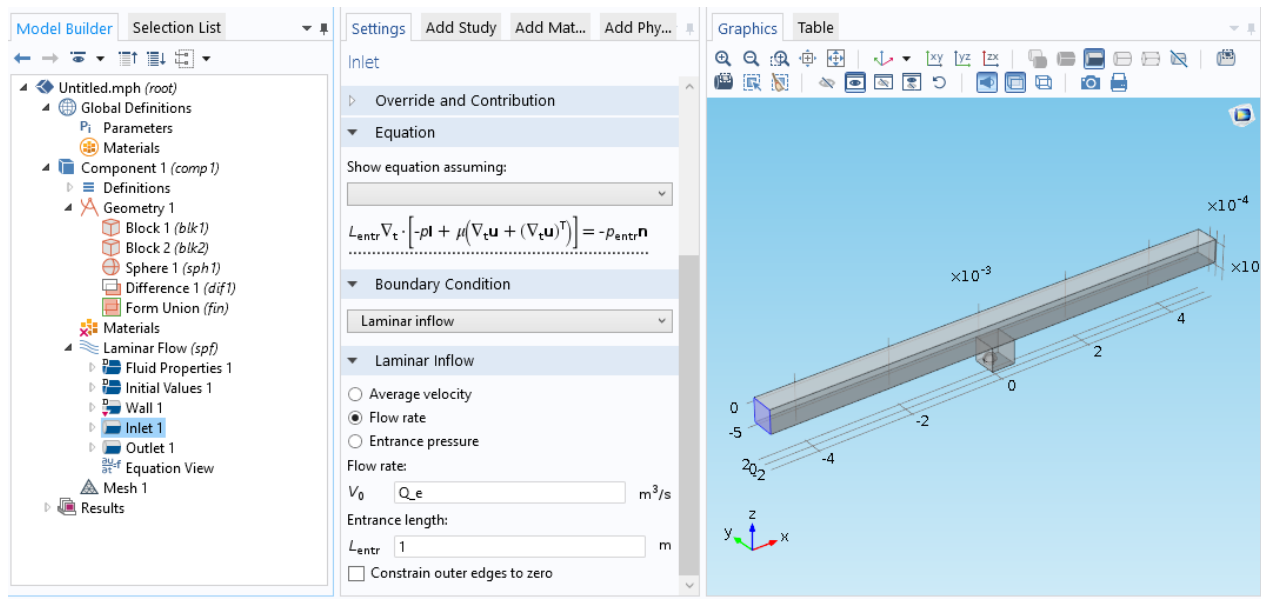
Name	Expression	Value	D
L	1[cm]	0.01 m	
w	500[um]	5E-4 m	
h	500[um]	5E-4 m	
d	250[um]	2.5E-4 m	
Q_e	1[L/min]	1.6667E-5 m ³ /s	
rho	1[g/cm^3]	1000 kg/m ³	
eta	1e-3[Pa*s]	0.001 Pa*s	
rho_T	1.02*rho	1020 kg/m ³	



Ajouter un nœud de dynamique des fluides avec un clic droit sur « Component 1 » et « Add physics » et en choisissant « Laminar Flow » (ci-dessus). En dynamique des fluides dans *COMSOL Multiphysics*®, les composants x, y, z de la vitesse sont définis par défaut comme u, v, w .



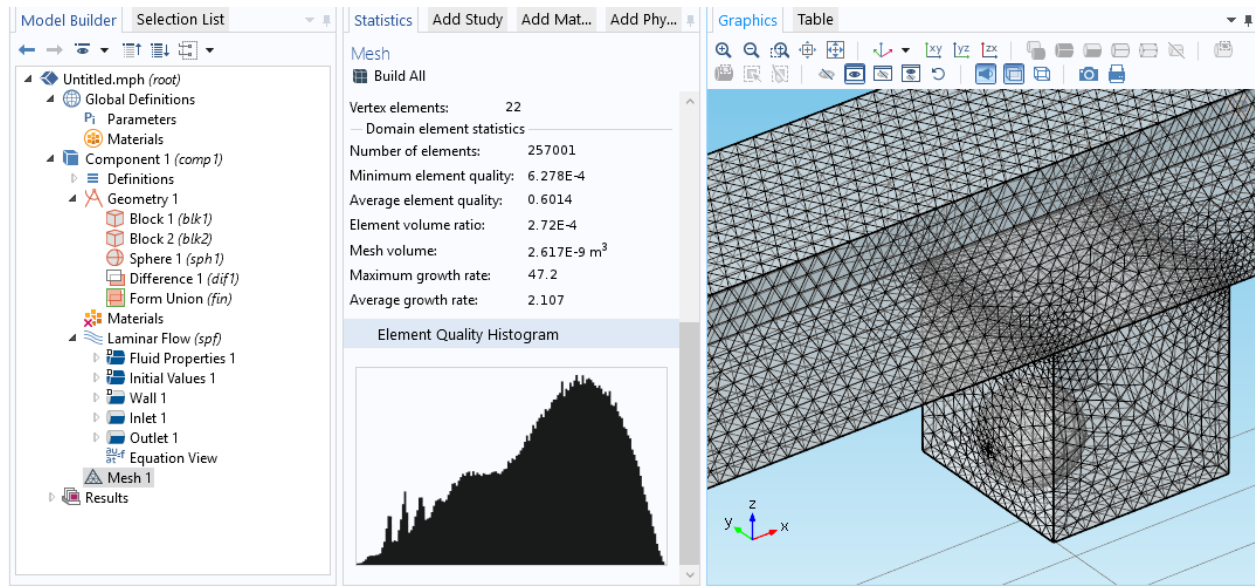
Les paramètres physiques de l'écoulement de l'eau doivent être introduits dans le nœud « Component 1 → Laminar Flow → Fluid Properties 1 » pour la densité ρ et la viscosité dynamique η . Il faut ajouter une entrée de fluide de débit « Laminar inflow » Q_e à la surface en amont avec un clic droit sur le nœud « Component 1 → Laminar Flow » et en choisissant « Inlet ». Il faut ajouter une sortie de fluide de pression « Pressure » nulle à la surface en aval avec un clic droit sur le nœud « Component 1 → Laminar Flow » et en choisissant « Outlet ». Il est possible d'ajouter un axe de symétrie sur la surface du milieu s'il a été dessiné avec l'option « Symmetry ».



3 Maillage

Étape préliminaire : Définition des paramètres de maillage (taille maximale/minimale des éléments) dans le nœud « Global Definitions → Parameters » si nécessaire. Ceux-ci peuvent dépendre des paramètres géométriques ou peuvent en être indépendants.

Le logiciel *COMSOL Multiphysics*® permet d'effectuer un maillage automatique optimisé pour la physique définie. La séquence automatique pour les phénomènes de mécanique des fluides est générée en sélectionnant le nœud « Component 1 → Mesh 1 », en choisissant « Physics-controlled mesh » et en choisissant le niveau de raffinement désiré du maillage avec 9 niveaux allant de « Extremely coarse » à « Extremely fine ». Des raffinements entre « Coarser » et « Finer » sont suffisants pour, respectivement, les solutions préliminaires d'analyse et les solutions finales. La qualité du maillage est vérifiée avec un clic droit sur le nœud « Component 1 → Mesh 1 » et en sélectionnant « Statistics ». On recherche une valeur moyenne au-delà de 0.5 et minimale positive.



4 Résolution

Étapes préliminaires : Définition des fonctions et paramètres à suivre (force de portance sur le tissu, contrainte de cisaillement maximale sur le tissu) et des valeurs critiques τ_{max} et F_g dans le nœud « Component 1 → Definitions → Variables » créé avec un clic-droit sur le nœud « Component 1 → Definitions ».

Définition de la force de portance : **Étape 1** Création de l'opérateur de somme sur les nœuds de la surface de la sphère. Clic-droit sur le nœud « Component 1 → Definitions » et choix de « Component Couplings → Integration ». Sélection des 8 surfaces de la sphère de tissu. Dans la section « Advanced » des paramètres de l'opérateur d'intégration, choisir la méthode « Summation over nodes ». Cet opérateur est, par défaut, nommé « intop1 ». **Étape 2** Ajout d'une variable « F_lift » dans le nœud « Component 1 → Definitions → Variables ». L'opérateur prédéfini « reacf » donne la valeur de la force réactive d'une surface fixe soumise à un fluide d'une certaine vitesse (composants x, y, z de la vitesse u, v, w). L'expression de la force de portance est « -intop1(reacf(w)) » pour avoir la force nette verticale générée par le fluide et ressentie par la totalité de la sphère.

Définition de la contrainte de cisaillement maximale : **Étape 1** Création de l'opérateur de maximum sur la surface de la sphère. Clic-droit sur le nœud « Component 1 → Definitions » et choix de « Component Couplings → Maximum ». Sélection des 8 surfaces de la sphère de tissu. Cet opérateur est, par défaut, nommé « maxop1 ». **Étape 2** Ajout d'une variable « maxShear »

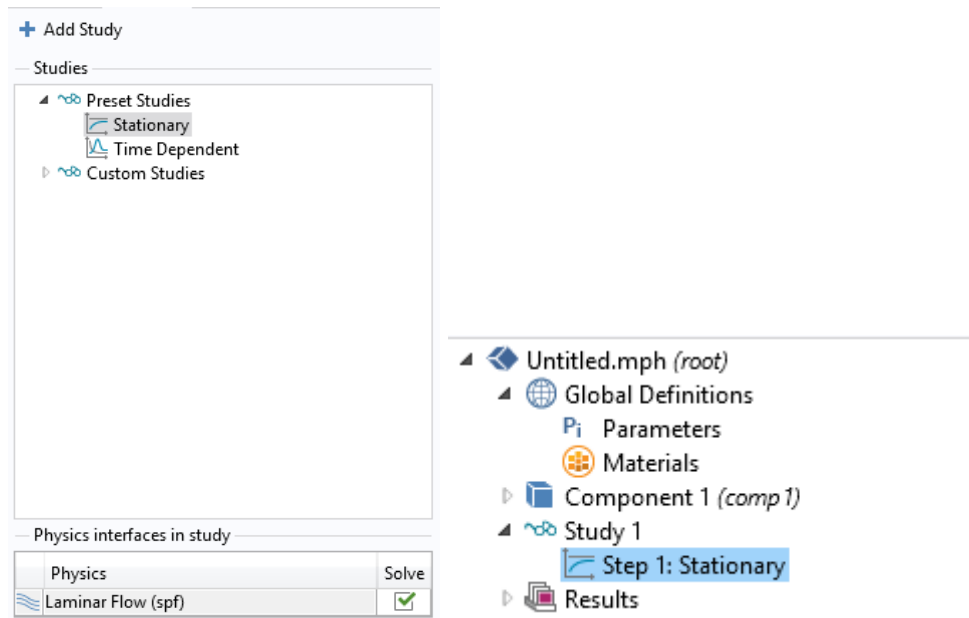
dans le nœud « Component 1 → Definitions → Variables ». Les variables prédéfinies spf.sr et spf.mu donnent respectivement les valeurs du taux de cisaillement et de la viscosité dans le domaine. L'expression de la contrainte de cisaillement maximale sur le tissu est « $\text{maxop1}(\text{spf.sr}*\text{spf.mu})$ » telle l'équation (3-5).

The screenshot displays the COMSOL Multiphysics software interface. On the left, the 'Component 1 (comp1)' tree shows the 'Definitions' node expanded, listing 'Variables 1', 'Integration 1 (intop1)', 'Maximum 1 (maxop1)', 'Boundary System 1 (sys1)', and 'View 1'. The 'Variables' table is visible, listing several variables and their expressions. The 'Integration' settings panel on the left shows the 'Label' as 'Integration 1', 'Operator name' as 'intop1', 'Geometric entity level' as 'Boundary', 'Selection' as 'Manual', and 'Method' as 'Summation over nodes'. The 'Graphics' window on the right shows a 3D model of a sphere with a red line passing through its center, overlaid on a gray background.

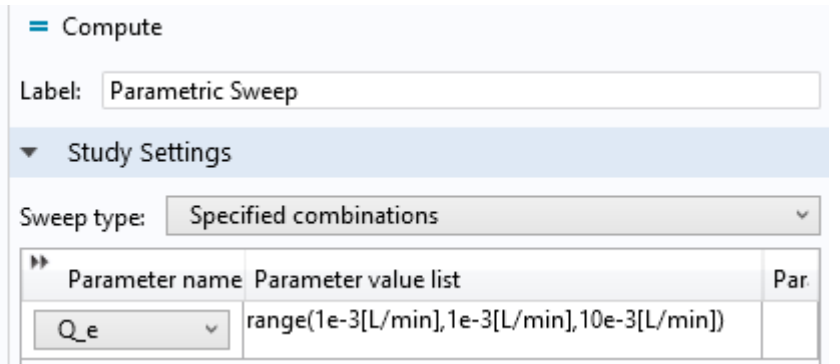
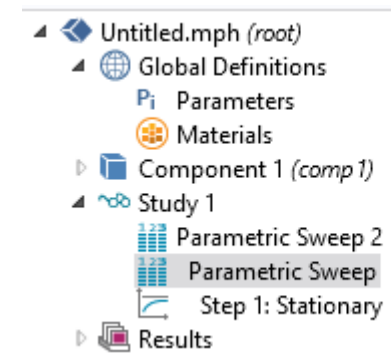
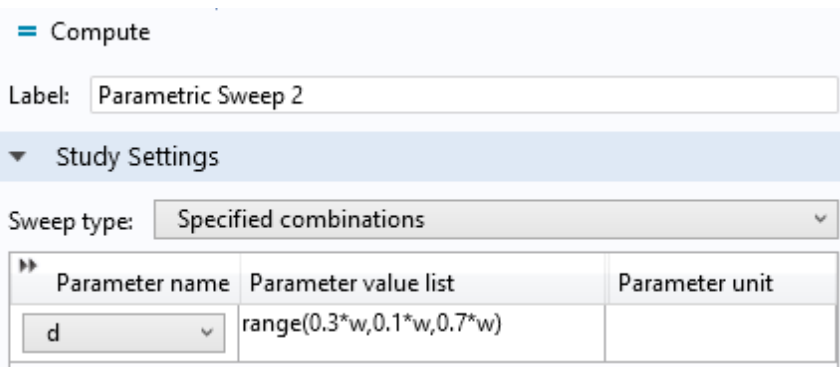
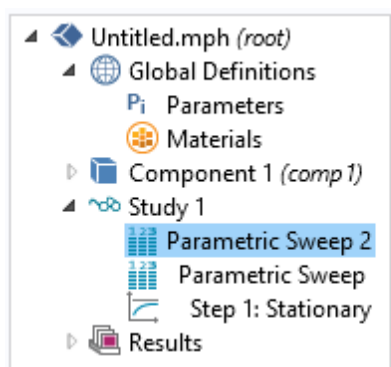
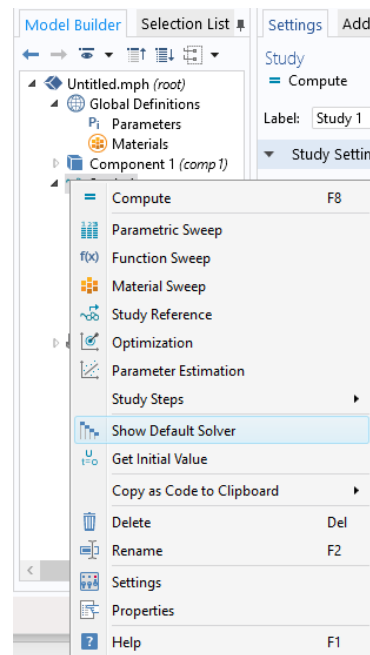
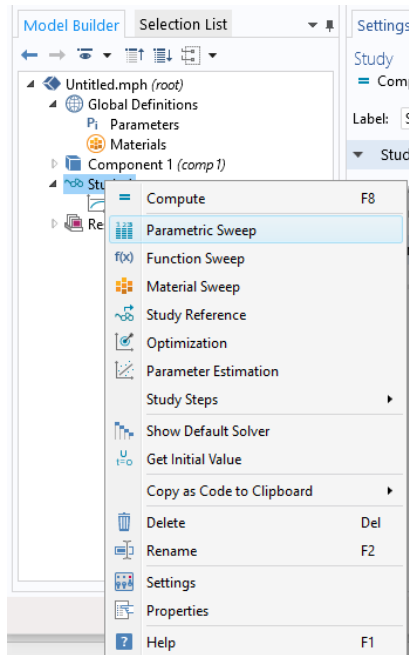
Name	Expression	Unit	Description
F_lift	-intop1(react(w))		
maxShear	maxop1(spf.sr*spf.mu)	Pa	
tau_max	1[Pa]	Pa	
F_g	$\pi d^3(\rho_T - \rho)g_{\text{const}}/6$	N	

La résolution des problèmes définis peut se faire avec un solveur dépendant du temps ou stationnaire. Dans le cas de la dynamique des fluides, un solveur stationnaire suffit, car un écoulement d'eau atteint son régime stationnaire rapidement. Dans le cas de la diffusion-réaction, le type de solveur dépend du temps caractéristique de diffusion ou de réaction t_{car} par rapport aux temps d'intérêt du problème à analyser et l'apport externe de nutriments t_{int} . Si $t_{\text{car}} \ll t_{\text{int}}$,

un solveur stationnaire suffit. Si $t_{car} \sim t_{int}$, un solveur dépendant du temps doit être utilisé. Un clic droit sur le nœud « Untitled.mph (root) » et sélectionner « Add Study » ou un clic droit sur « Study 1 » permet d'ajouter un nœud de solveur (Study Step) stationnaire ou dépendant du temps.

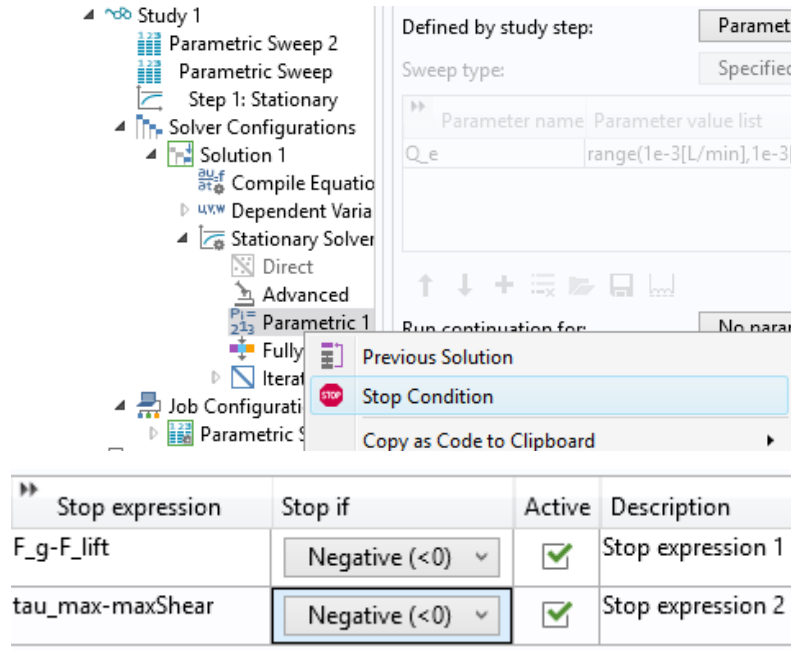


Le solveur stationnaire par défaut est suffisant pour une étude de dynamique des fluides. Il faut aussi rajouter deux nœuds de balayages paramétriques. Le premier est utilisé pour les balayages géométriques (w , h ou d) et le deuxième est utilisé pour les balayages physiques (Q_e). Les étapes du solveur par défaut peuvent être ensuite générées automatiquement avec un clic droit sur le nœud « Study 1 » et « Show Default Solver ».



Afin de trouver les débits critiques Q_{shear} et Q_{lift} , il faut interrompre le balayage paramétrique sur le débit Q_e . Pour faire cela, il faut ajouter une condition d'arrêt sur le cisaillement maximum « maxShear » ou la force de portance « F_lift » avec un clic droit sur le nœud du solveur paramétrique « Study 1 → Solver Configurations → Solution 1 → Stationary Solver 1 → Parametric 1 ». L'expression de la condition d'arrêt est le débit où

« maxShear » dépasse le cisaillement maximum $\tau_{max} = 1 \text{ Pa}$ et le débit où « F_lift » dépasse la force de gravité $F_g = \pi d^3(\rho_T - \rho)g/6$. Il faut choisir l'une OU l'autre des conditions pour voir les courbes complètes de Q_{lift} ou Q_{shear} .



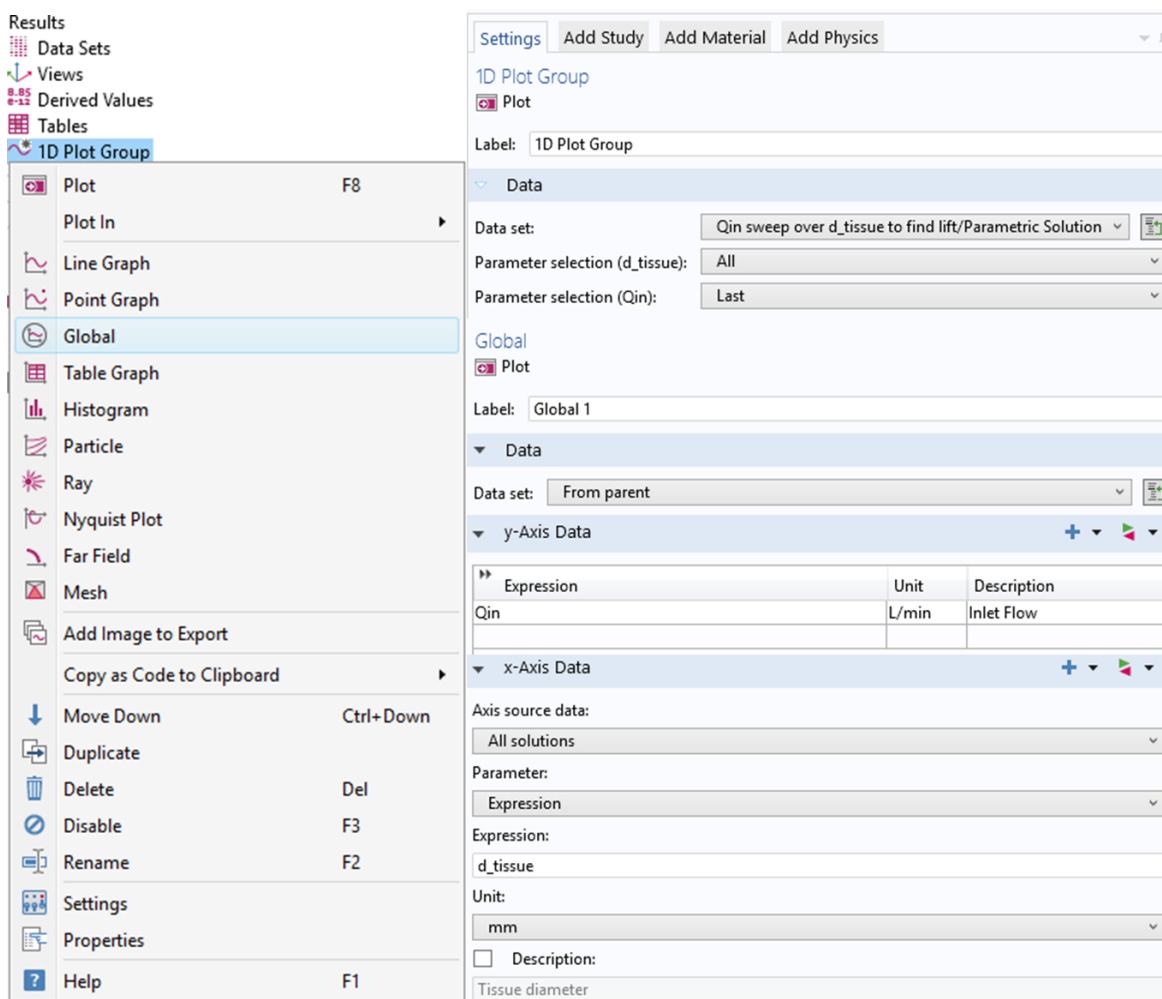
Lancer l'étude paramétrique stationnaire permet donc de retrouver les débits critiques Q_{shear} et Q_{lift} en fonction des paramètres géométriques h , w et d . Trouver la solution peut prendre entre quelques minutes et quelques jours dépendamment des paramètres choisis précédemment :

- Physique : Discrétisation (paramètre avancé) du problème avec des polynômes plus élevés → Temps de résolution plus élevé et résultats plus précis.
- Maillage : Taille des éléments plus fins → Temps de résolution plus élevé et résultats plus précis. Si les éléments sont trop fins, la propagation d'erreurs numériques réduit la précision des résultats.
- Résolution : Paramétrage plus fin → Temps de résolution plus élevé et meilleure continuité de la paramétrisation.

5 Présentation

Une fois les solutions trouvées, le logiciel *COMSOL Multiphysics*® permet d'effectuer la présentation des résultats et l'exportation des données à un format gérable par d'autres applications de traitement de données (.csv, .txt ou .dat). Pour les diagrammes de phase de débits critiques, un

dessin des Q_{lift} et Q_{shear} en fonction de la paramétrisation choisie est facile en ajoutant un nœud de figure 1D avec un clic droit sur le nœud « Results » en choisissant « 1D Plot Group ». En sélectionnant tous les paramètres (Parameter selection : All) pour le paramètre géométrique et uniquement le dernier paramètre résolu (Parameter selection : Last) pour le débit dans le nœud « 1D Plot Group », seules les configurations critiques sont dessinées. Un clic droit sur ce nœud permet aussi de générer un nœud « Global » qui donne l'option de dessiner un paramètre variable (Q_e) en ordonnées en fonction d'un paramètre géométrique (h, w, d) en abscisses.



Ces étapes permettent de générer les diagrammes de phases inclus dans l'article du Chapitre 4. Elles peuvent aussi être appliquées à la diffusion-réaction avec une étude dépendante du temps et un seuil sur la concentration minimale dans le tissu à la constante de Michaelis-Menten k_M pour trouver les temps d'échange du milieu.

ANNEXE B – RÉSULTATS À PARAÎTRE DANS L'ARTICLE DE MOHANA MARIMUTHU

Cette annexe présente les versions courantes des figures à paraître dans l'article de Mohana Marimuthu. L'article du Chapitre 4 sera utilisé comme justification du design des orifices des gouttelettes. La forme des orifices et la taille de la gouttelette permettent de protéger les sphéroïdes synthétisés dans le PMÉ à gouttelettes nommé « SIMSS chip ».

Des figures du profil de vitesses du fluide et de la diffusion d'espèces du canal vers le puits permettront de démontrer graphiquement la protection des sphéroïdes et l'apport suffisant en nutriments.

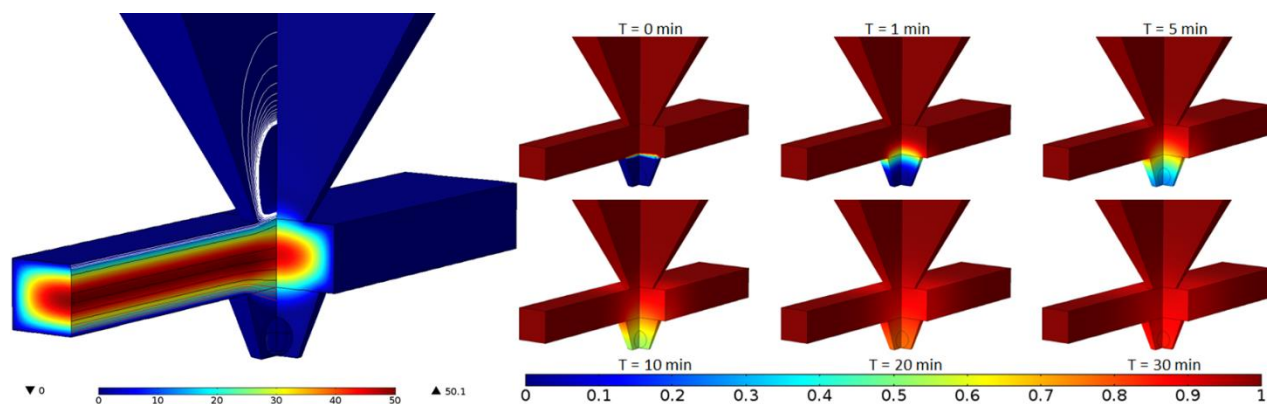


Figure C-1 : Profil de vitesse du fluide (mm/s) et dynamique de la diffusion (concentration normalisée) après un échange du milieu dans le dispositif de Mohana Marimuthu.

Une figure montrant la pression à la première gouttelette, telle que définie à la section 2.2, permettra de démontrer les débits maximums et la dynamique de remplissage du dispositif pour différentes conditions de remplissage.

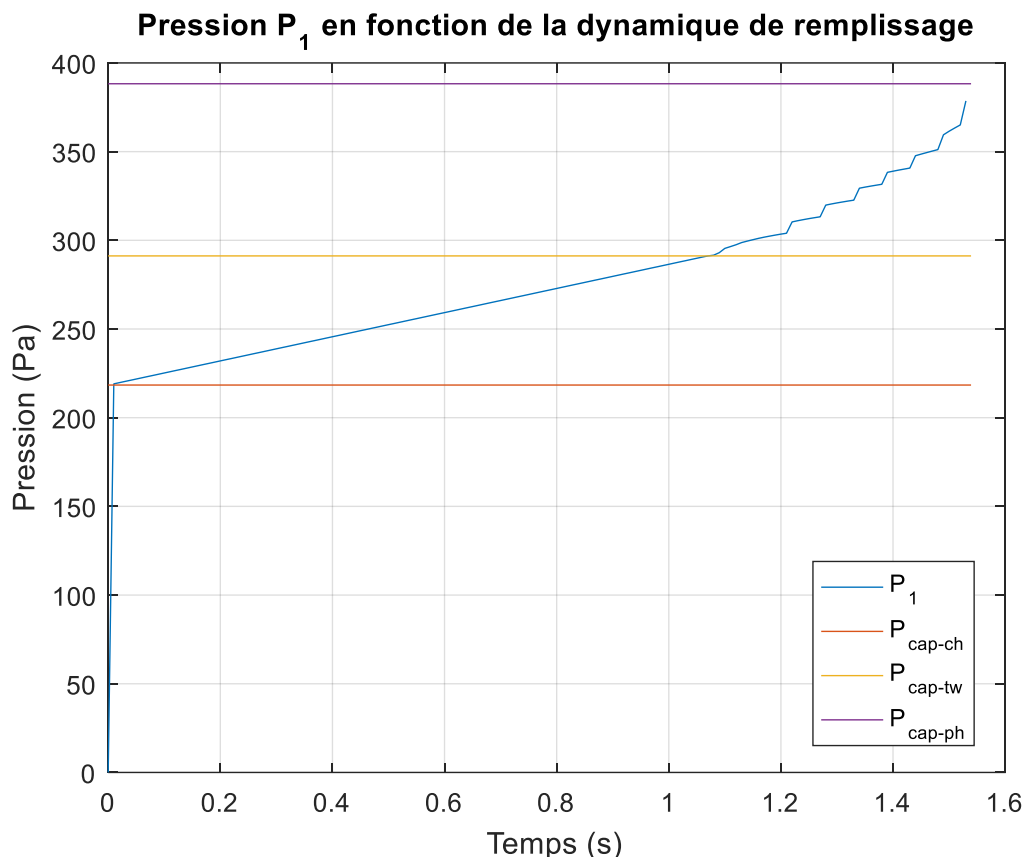


Figure C-2 : Pression à la première gouttelette en fonction de la dynamique de remplissage du « SIMSS chip » à 8 puits et 9 mL/min. Le premier régime en deçà de 1.06 s est un régime de remplissage du canal principal. La pression est en deçà de la pression capillaire du canal secondaire (P_{cap-tw}) et au-delà de la pression capillaire du canal principal (P_{cap-ch}). Le deuxième régime entre 1.1 et 1.5 s est un régime de remplissage des canaux secondaires. L'effet « escalier » est caractéristique de la pression qui augmente pour remplir les 7 autres canaux secondaires. Si la pression P_1 dépasse la pression capillaire de l'orifice de la gouttelette (P_{cap-ph}), le dispositif fuit, ce qui n'est pas le cas ici.

La Figure 5-1 sera aussi incluse (avec un volume corrigé pour la sous-figure B) afin d'établir le nombre minimum et maximum de pièges en série. Selon cette figure, pour du PDMS légèrement hydrophobe ($\theta_{cap} \approx 100^\circ$) si N, le nombre de pièges en série, est :

- En deçà de 5 pièges : le tissu peut être endommagé par des contraintes de cisaillement trop élevées;

- Entre 5 et 48 pièges : le dispositif fuit avant que le tissu soit potentiellement endommagé et les tissus peuvent être éjectés du piège (**conception optimale**);
- Au-delà de 48 pièges : le dispositif fuit avant que le tissu soit potentiellement endommagé ou éjecté – le tissu est piégé indéfiniment (ou jusqu'à ce que le dispositif fuie).
- En deçà de 68 pièges : le dispositif prend moins de deux minutes à se remplir avec un débit égal à 50 % du débit maximum de fuite.

Ces résultats établissent un cadre de conception des « SIMSS chip » et les règles d'opération et de design seront utiles à la fabrication de ces dispositifs en plus grande échelle (un nombre de puits grandissant).